Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
Tübingen
Direktor: Professor Dr. Koslowski

UNTERSUCHUNGEN ZUR DESOXYRIBONUCLEOSIDTRI-PHOSPHATSYNTHESE MALIGNER TUMOREN:

Steuerungsmechanismen der Ribonucleosiddiphosphatreduktion und deren Beeinflußbarkeit durch cytocide Agentien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Franz Kraml
aus Vohenstrauss

77 294

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0080

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
Tübingen
Direktor: Professor Dr. Koslowski

UNTERSUCHUNGEN ZUR DESOXYRIBONUCLEOSIDTRI-PHOSPHATSYNTHESE MALIGNER TUMOREN:

Steuerungsmechanismen der Ribonucleosiddiphosphatreduktion und deren Beeinflußbarkeit durch cytocide Agentien

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Franz Kraml
aus Vohenstrauss

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 1977

Dekan:	Professor Dr.H. Auterhoff
1. Berichterstatter:	O.A.P.-D.Dr. D. Kummer
2. Berichterstatter:	Pr. Dr. J. Schultz

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Oberarzt Privat-Dozent Dr. D. Kummer, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich herzlich für seine zahlreichen Ratschläge und seine stets wohlwollende Unterstützung.
Zugleich danke ich Herrn Professor Dr. Heller und Herrn Dr.Dr. Schmidt für viele Anregungen.
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Actinomycin-C
ADP	Adenosindiphosphat
ARA-C	Cytosinarabinosid
ATP	Adenosintriphosphat
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
d	"desoxy" in Nucleotiden
dTTP	Desoxythymidintriphosphat (syn. Thymidintriphosphat)
DA	Daunomycin
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EATC	Ehrlich-Ascites-Carcinom-Cells
E.C.	Enzyme-Catalog
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IR	Infrarot
K_m	MICHAELIS-Konstante
Min.	Minute(n)
$NADPH_2$	$NADPH+H^+$, reduziertes NADP
NDP	Ribonucleosiddiphosphatreduktase
PEI-	Polyäthylenimin-
RNA	Ribonucleinsäure
Stdn.	Stunden
TTP	(syn. dTTP) Desoxythymidintriphosphat
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODIK 3

1. Material 3

2. Methodik 6

A. Trennung und quantitative Bestimmung der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate in Ascites-Tumorzellen und in soliden Malignomen des Menschen 6

a. Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen 6
b. Solide Malignome des Menschen 13

B. Messung des ^{14}C-Thymidin-, ^{14}C-Desoxyuridin- und ^{14}C-Uridineinbaus in Ascites-Carcinomzellen und solide Malignome des Menschen 14

a. Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen 14
b. Solide Malignome des Menschen 15

C. Messung der Einbauraten von ^{14}C-Adenin, ^{14}C-Cytidin und ^{14}C-Uridin getrennt in die DNA und RNA von Ascites-Tumorzellen und solide Malignome des Menschen 16

D. Bestimmung der Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase im zellfreien System von Ascites-Tumorzellen und soliden Geweben 17

a. Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen 17
b. Enzymextraktion aus soliden Geweben 22
c. Regenerierende Rattenleber/partielle Hepatektomie 22

III. ERGEBNISSE

1. Quantitative Messungen der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphatkonzentrationen 23

2. Messungen an intakten Zellen zur Ribonucleosiddiphosphatreduktion 29

3. Messung der Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase im zellfreien System 31

A. Allgemeine Eigenschaften der Ribonucleosiddiphosphatreduktase 31

B. Hemmung und Stimulierung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase durch allosterische Effektoren 38

C. Aktivität der Ribonucleosiddiphophatreduktase bei Applikation cytocider Substanzen 42

a. Alkylierende Substanzen 42
b. Antibiotika mit cytostatischer Wirkung 43
c. Antimetabolite 47
d. Hydroxyharnstoff 51

IV. DISKUSSION 52

V. ZUSAMMENFASSUNG 57

VI. LITERATUR 58

I. EINLEITUNG

Die Erforschung der Regelkreise der DNA-Synthese hat für die Zellkinetik von malignem und regenerierendem Gewebe wesentliche Bedeutung. Die Bestimmung und der Vergleich von Festgrößen im Nucleinsäurestoffwechsel ermöglicht Aussagen über die Proliferationsrate von Zellen und Geweben.
Als Parameter können u.a. Aktivitäten DNA-synthetisierender Enzyme oder der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA gewählt werden.
Das Nucleosid Thymidin wird als DNA-spezifischer Baustein in die Zelle eingeschleust und zu d-Thymidintriphosphat phosphoryliert (s. Abb.1). Als Schlüsselenzym dieser "salvage-pathway"-Synthese des Desoxythymidintriphosphats ist die Thymidinkinase (E.C. 2, 7,1,21) anzusehen. Darüber hinaus besitzt die Zelle die Möglichkeit, Desoxythymidintriphosphat über die "de novo"-Synthese aufzubauen, wobei der Ribonucleosiddiphosphatreduktase (E.C. 1,17,4,1) entscheidende Bedeutung zukommt.

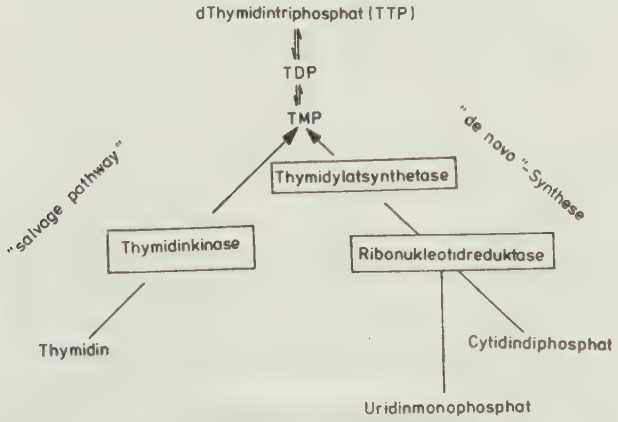


Abb. 1: Synthesewege und Schlüsselenzyme der Desoxythymidintriphosphatsynthese

Sie ist induzierbar und reduziert die Ribose an C_2' unter Erhalt der Glykosidbindung (Abb. 2).

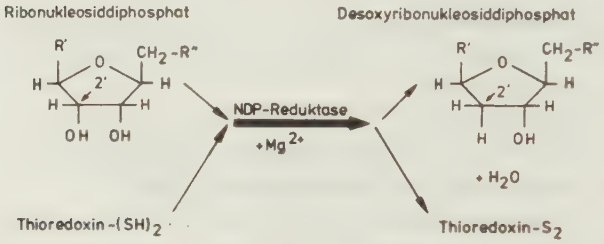


Abb. 2: Schema der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktion

Durch die Zugabe von Thymidin zum Medium ($2-3 \times 10^{-3}$ M) werden prolifierende Zellen in der G_1/S-Phase arretiert. Man erzielt hierdurch gute Synchronisationseffekte an Hela-Zellen (1) und an diploiden Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen (2). Diese Effekte sind sicherlich durch Aktivierungs- und Inhibitionsmechanismen der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktion bedingt (3-10).

Vorliegende Untersuchungen sollen Aufschluß darüber geben, ob unterschiedliche Steuermechanismen der Desoxyribonucleosidtriphosphatsynthese in malignen Tumoren und in proliferierenden Geweben wie regenerierender Rattenleber bestehen.

Hierzu werden die Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphat-Konzentrationen in verschiedenen malignen Tumoren und die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase in Ehrlich-Ascitescarcinom- und Yoshida-Ascitessarkomzellen und regenerierender Rattenleber gemessen.
Ferner wird die allosterische Steuerung und die Beeinflussung der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase durch cytocide Substanzen untersucht.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Material

A. Geräte

Ultrazentrifuge L4 mit Rotortyp 65, Beckmann

MSE-Hochgeschwindigkeitszentrifuge mit Rotortyp 69/82

TLC-Fluoreszenzscanner MPF3, Perkin-Elmer

Fluoreszenzspektralphotometer MPF3, Perkin-Elmer

Registrierendes Spektralphotometer DMR10, Zeiss

Radiochromatogrammscanner II, Berthold

Flüssigkeitsscintillationszähler Isocap 300, Nuclear-Chikago

Integrating Infrared Spectrophotometer, Perkin-Elmer

Birchover Isotopencamera mit Polaroidfilmen 300, Typ 107

Ultrafiltrationssysteme mit Biofiber 50, Bio-Rad

B. Tiermaterial

Diploide Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen werden durch intraperitoneale Transplantation in weibliche Mäuse (Stamm NMRI) und weibliche Ratten (Stamm Sprague-Dawley) erhalten.

C. Chemikalien

Nichtmarkierte Ribonucleoside und Ribonucleotide von Serva-Lab, Heidelberg

(U-^{14}C) Adenosin 5'-diphosphat als Ammoniumsalz 550mCi/mMol

(U-^{14}C)Adenosin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 500mCi/mMol

(U-^{14}C)Desoxyadenosin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 450 mCi/mMol

(U-^{14}C)Guanosin 5'-diphosphat als Ammoniumsalz 550mCi/mMol

(U-^{14}C)Guanosin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 550mCi/mMol

(U-^{14}C)Desoxyguanosin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 550 mCi/mMol

(U-^{14}C)Cytidin 5'-diphosphat als Ammoniumsalz 540mCi/mMol
(U-^{14}C)Cytidin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 540mCi/mMol
(U-^{14}C)Desoxycytidin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 540mCi/mMol
(U-^{14}C)Uridin 5'-diphosphat als Ammoniumsalz 450mCi/mMol
(U-^{14}C)Uridin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 450mCi/mMol
(U-^{14}C)Desoxythymidin 5'-triphosphat als Ammoniumsalz 500mCi/mMol
(5-^{3}H)Cytosin ß-D-arabinosid 23mCi/mMol

Alle radioaktiven Substanzen wurden vom Radiochemical-Centre, Amersham, England, bezogen.
PPO (2,5-Diphenyloxazol), POPOP (1,4-Bis-2-[4-Methyl-5-phenyloxazolyl] -Benzol), Soluene TM100, Instagel Emulsifier für wässrige Proben, Sample Solubifier und Dimilume 30 von Packard Instruments, Frankfurt;
TC-Bovine Serum, TC Vitamins Minimal Eagle 100X, TC-Hanks-Solution von Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA;
Dithioerythrit von Serva-Lab, Heidelberg.

Alle im weiteren nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von E. Merck aus Darmstadt bezogen.

D. Dünnschichtplatten

Silikagel-Dünnschichtchromatographie-Platten 5715 F_{254} (20x20x0,25), Merck, Darmstadt;
Cellulose-Polyäthylenimin-MN300, F_{254}-Dünnschicht-chromatographieplatten (20x20x0,1), Macherey & Nagel, Düren.

E. Sorbentien für die Säulenchromatographie

DEAE-Cellulose 23SH, Serva-Lab, Heidelberg;
DEAE-Sephadex A25, Pharmacia, Frankfurt.

F. Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

a. Butanol (2)	35,0 ml
Essigsäure (96 %)	15,0 ml
Aceton	25,0 ml
dest. Wasser	10,0 ml.
b. Butanol (2)	10,0 ml
Aceton	30,0 ml
Methanol	10,0 ml
LiCl	2,0 g
dest. Wasser ad	100,0 ml.

c. Eine 1,5 M wässrige Lithiumchloridlösung wird bei Zimmertemperatur mit Borsäure gesättigt und mit konz. Ammoniaklösung auf pH 7 gebracht.

d. LiCl	1,5 Mol
Natriumacetat	0,5 Mol
Eisessig (96 %)	0,5 Mol
dest. Wasser ad	100,0 ml.

G. Pufferlösungen für die Säulenchromatographie

a. Phosphatpuffer 0,04 M; pH 7
b. Phosphatpuffer 0,075 M; pH 7
c. Phosphatpuffer 1,30 M; pH 7
d. 0,012 Mol Magnesiumchlorid und 0,015 Mol Trishydroxymethylaminomethan werden zu 1000 ml dest. Wasser gelöst und mit konz. Salzsäure auf pH 7 gebracht.
e. Natriumchlorid; dest. Wasser 1,0 M.

H. Cytostatika

Trenimon^{R} (2,3,5, Trisäthyleniminobenzochinon, Bayer);
Sanamycin^{R} (Actinomycin C, Bayer);
Lyovac-Cosmegen^{R} (Actinomycin D, Sharp & Dohme);
Adriblastin^{R} und Daunoblastin^{R} (Adriamycin und Daunomycin, Farmitalia);

Methotrexat^{R} (Amethopterin, Lederle);
Purinethol^{R} (6-Merkaptopurin, Wellcome);
Cytosinarabinosid und Bleomycin (Mack, Illertissen);
Litalir^{R} (Hydroxyharnstoff, Heyden).

2. Methodik

A. Trennung und quantitative Bestimmung der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate in Ascites-Tumorzellen und in soliden Malignomen des Menschen

a. Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen

α. Gewebsextraktion

Die nach Transplantation intraperitoneal gewachsenen Zellen werden gesammelt und gewaschen. Je Milliliter gewaschener und bei 1000 g gepackter Zellen werden 5 ml Trichloressigsäure hinzugefügt und in ein Eisbad gebracht. Nach 30 Minuten wird die Suspension (12 000 g, 4° C, 10 Min.) zentrifugiert. Der Überstand, der die Nucleotide enthält, wird 5x ausgeäthert, um die überschüssige Trichloressigsäure zu entfernen. Danach stellt man mit wässriger Ammoniaklösung (2,5 %) auf pH 7 ein. Die neutrale Lösung wird gefriergetrocknet und in einem kleinen Volumen Perchlorsäure (5 %) aufgenommen. Unlösliche Partikel werden durch Ultrazentrifugation (100 000 g, 4° C, 60 Min.) abgetrennt. Die klare Lösung wird mit konz. wässriger Ammoniaklösung auf pH 10 gebracht und unter den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Den Überstand neutralisiert man mit verdünnter Essigsäure (10 %) und lyophilisiert ihn. Das Lyophilisat wird in wenig dest. Wasser aufgenommen und zur Chromatographie auf Kieselgel verwendet.

ß. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel

Ein Aliquot des Gewebeextraktes wird bandförmig mit einer Mikropipette auf eine DC-Platte aufgetragen und nach dem Trocknen in einem kalten Luftstrom aufsteigend mit Laufmittel II,1,F,a gewaschen. Dabei verbleiben die Ribonucleosidphosphate auf der Auftragestelle, während begleitende Salze und Proteine weggewaschen werden. Nach einem Zwischentrocknen werden die Ribonucleosidphosphate mit Laufmittel II,1,F,b chromatographiert.

Die Lokalisation der getrennten Banden erfolgt unter UV-Licht (254 nm) (s. Abb.3).

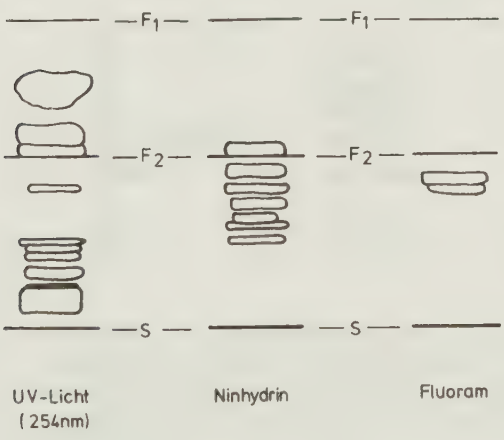


Abb. 3: Ergebnis der chromatographischen Trennung des Zellextraktes aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen.
Das Chromatogramm wurde außerdem mit Ninhydrin und Fluoram besprüht.
F_1 = Front von Laufmittel II,1,F,a
F_2 = Front von Laufmittel II,1,F,b
S = Start

Durch Markierung des Gewebsextraktes mit ^{14}C-Referenzsubstanzen konnte nachgewiesen werden, daß die Ribonucleosidtriphosphate in zwei Banden lokalisiert sind. Die nächst der Startlinie liegende enthält ATP, dATP, GTP, dGTP, CTP und dCTP (Fraktion 1), die darüberliegende UTP und Desoxythymidintriphosphat (Fraktion 2, s. Abb. 4). Die weitere Analyse zeigte noch eine Verunreinigung der Ribonucleosidtriphosphate mit Ribonucleosiddi- und Ribonucleosidmonophosphaten an.

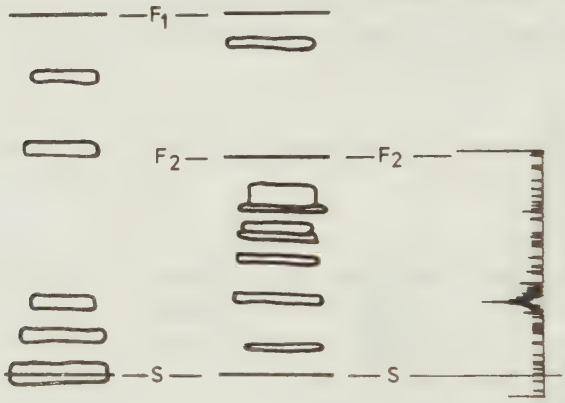


Abb. 4: Links ist das Chromatogramm des Gewebsextraktes eines Wilms'-Tumor nach dem Lauf mit Fließmittel II,1,F,a wiedergegeben. In der Mitte sieht man das Ergebnis der Trennung mit Laufmittel II,1,F,b. Wiederum sind deutlich die Banden von Fraktion 1 und 2 zu erkennen. Der Gewebsextrakt war in diesem Falle mit ^{14}C-Uridintriphosphat markiert, rechts die Position der heißen Referenzsubstanz im Radiochromatogramm.
F_1 = Front von Laufmittel II,1,F,a
F_2 = Front von Laufmittel II,1,F,b
S = Start.

Die beiden Banden von Interesse (je Fraktion 1 oder 2) werden durch folgenden Vorgang geschärft:
Eine Zone der Kieselgelschicht um die Bande wird mit einem Skalpell abgekratzt. An die kurze Seite der ribonucleosidtriphosphattragenden Bande legt man einen Filtrierpapierstreifen, auf den man in kleinen Portionen destilliertes Wasser aus einer Kapillare oder aus einer Hamiltonspritze gibt. Das Lösungsmittel wandert hierbei über die Kieselgelschicht und konzentriert die Ribonucleosidtriphosphate auf der gegenüberliegenden Seite (Abb. 5).

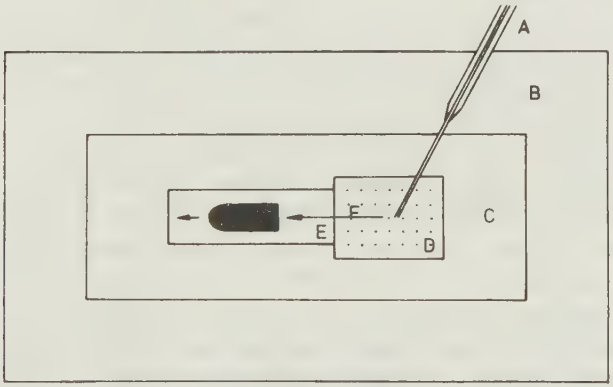


Abb. 5: Die Abbildung zeigt den Vorgang des Schärfens einer Bande nach der Chromatographie auf Kieselgel.
A = Kapillare
B = Kieselgelschicht
C = ausgekratzte Fläche
D = Filtrierpapierstreifen
E = Kieselgelschicht mit Bande
F = Laufrichtung des Eluens

Nach dem Trocknen unter einem kalten Luftstrom kann dieser Vorgang wiederholt werden. Die so geschärfte Bande wird abgekratzt und in ein Plastikröhrchen zum Eluieren überführt. In dieses gibt man 2 ml destil-

liertes Wasser und eluiert durch kräftiges Schütteln. Danach zentrifugiert man bei 12 000 g (4°C, 10 Min.) ab und verwendet den klaren Überstand zur Chromatographie auf einer PEI-Cellulose-Dünnschichtplatte.

γ. Dünnschichtchromatographie auf einer PEI-Celluloseplatte

Das Eluat von Fraktion 1 und 2 wird nach der von FOSTER (11) angegebenen Methode auf je eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Dabei werden die Ribonucleosidtriphosphate in einem kleinen Fleck an den Ionenaustauscher gebunden, während restliche Salze und Proteine weggewaschen werden. Nach dem Trocknen in einem kalten Luftstrom entwickelt man mit Laufmittel II,1,F,c. Vor dem Lauf in die zweite Dimension muß die DC-Platte gründlich von Lithiumchlorid und Borsäure befreit werden. Dazu wäscht man aufsteigend mit Methanol, Methanol-Trishydroxyäthylaminomethan (0,5 %) und mit destilliertem Wasser. Danach überführt man die DC-Platte für 15 Minuten in ein Bad mit absolutem Methanol und wäscht nach dem Trocknen in einem kalten Luftstrom nochmals aufsteigend mit destilliertem Wasser. Die Entwicklung des Chromatogramms in der zweiten Dimension erfolgt mit Laufmittel II,1,F,d. Nach dem Trocknen in einem kalten Luftstrom können die getrennten Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate unter einfallendem UV-Licht (254 nm) lokalisiert werden. Die Position der getrennten Ribonucleotide ist in Abb. 6a und 6b wiedergegeben.

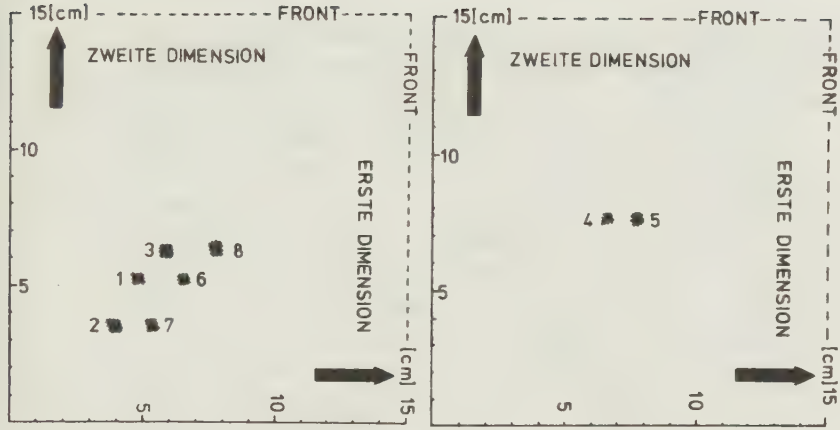


Abb. 6a und 6b: Position der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate nach einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie auf einer PEI-Celluloseplatte.
1. ATP 2. GTP 3. CTP 4. UTP
5. dTTP 6. dATP 7. dGTP 8. dCTP

8. Quantitative Bestimmung

Die getrennten Ribonucleosidtriphosphate können direkt quantitativ (12) mit einem Fluoreszenz-Dünnschichtscanner (Perkin-Elmer MPF3) erfaßt werden. Die Konzentration ist der Fluoreszenzlöschung direkt proportional, wenn die Flächen der registrierten Kurven als Parameter der Ribonucleosidtriphosphatkonzentrationen verwendet werden. Wie man aus Abbildung 7 ersehen kann, ergeben Referenzsubstanzen lineare Eichkurven.

Die Erfassungsgrenze liegt bei 5 nMol. Der Gehalt der Desoxyribonucleosidtriphosphate kann im allgemeinen nicht durch Abtasten im Scanner bestimmt werden, da die Konzentrationen zu gering sind. Man fügt daher dem Gewebsextrakt radioaktiv markierte

Desoxyribonucleosidtriphosphate zu und lokalisiert sie mit dem Radiochromatogrammscanner (Bertold II) (s. Abb. 8).

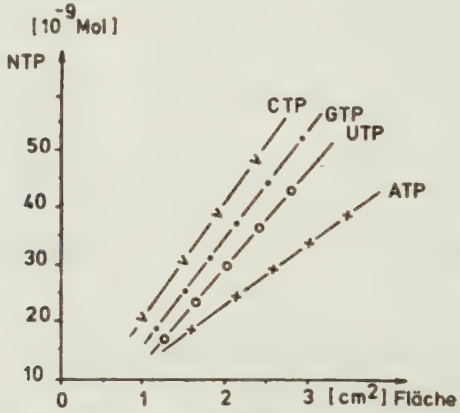


Abb. 7: Die Abbildung gibt die Eichkurven für die direkte fluorimetrische Bestimmung der Ribonucleosidtriphosphate wieder.

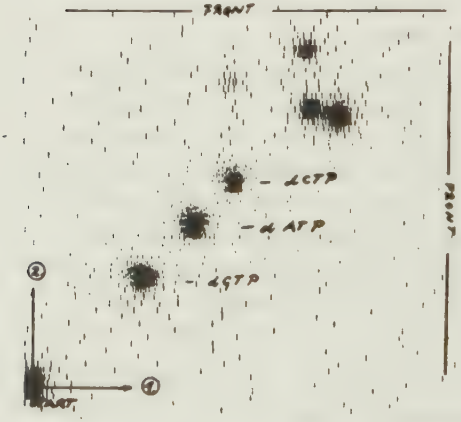


Abb. 8: Zweidimensionale Trennung von Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphaten, denen ^{14}C-Desoxyribonucleosidtriphosphate als heiße Markierungssubstanzen zugefügt waren. In der rechten oberen Ecke sind nicht näher identifizierte radioaktive Verunreinigungen zu erkennen.

Die Position der radioaktiven Flecke wird auf der DC-Platte mit einem weichen Bleistift markiert, und die umrandete Celluloseschicht wird mit N/10-Salzsäure extrahiert. In einem registrierenden Spektralphotometer wird die Extinktionskurve des ribonucleotidhaltigen Eluates zwischen 230 nm und 290 nm aufgezeichnet, wobei in den Referenzstrahl das blanke Eluat einer gleich großen Fläche gebracht wird. Die Differenz aus minimaler und maximaler Extinktion dient als Maß der Konzentration. Die Erfassungsgrenze liegt bei 0,5 nMol, wenn zur photometrischen Bestimmung Mikrozellen eingesetzt und kleinste Lösungsmittelmengen verwendet werden.

b. Solide Malignome des Menschen

Die Tumoren werden sofort nach der Exstirpation aufgearbeitet. Man befreit sie mit einem Skalpell von anhaftendem Bindegewebe und nekrotischen Bezirken.

α. Tumoren weicher Konsistenz

Man drückt sie durch ein Teesieb (Maschenweite 600-700 µm) und suspendiert die Zellen in eiskalter Ringerlösung. Die gewaschenen und gepackten Zellen (1000 g) werden mit dem Ultraturrax bei maximaler Umdrehungszahl unter Eiskühlung homogenisiert und sofort mit dem doppelten Volumen eiskalter Trichloressigsäure (5 %) versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie unter II,2,A,a,α-δ angegeben.

ß. Tumoren derber Konsistenz

Nachdem man sie in 10 mm lange, 4 mm breite und 4 mm hohe Streifen geschnitten hat, werden sie mit dem doppelten Volumen eiskalter Ringerlösung übergossen und bei maximaler Umdrehungszahl des Ultraturrax unter

Eiskühlung homogenisiert. Der Zellbrei wird mit dem gleichen Volumen eiskalter Trichloressigsäure (10 %) versetzt und in ein Eisbad für 30 Minuten überführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie unter II,2,A,a, α-δ angegeben.

B. Messung des ^{14}C-Thymidin-, ^{14}C-Desoxyuridin- und ^{14}C-Uridineinbaus in Ascitestumorzellen und solide Malignome des Menschen (13, 14)

a. Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen

Ascites vom diploiden Ehrlich-Carcinom oder vom Yoshida-Sarkom wird 5 bzw. 10 Tage nach Überimpfung unter sterilen Bedingungen abpunktiert und mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH 7,4) bzw. Nährmedium nach LIMBURG (15) so verdünnt, daß die Suspension ca. $10x10^6$ Zellen/Milliliter enthält. 1000 IE. Heparin pro Milliliter verhindern ein Verklumpen der Zellen, ohne selbst die Einbauraten zu beeinflussen.

Dem Ansatz von 40 ml Zellsuspension wird die Testsubstanz in der angegebenen Konzentration zugegeben. Ein Kontrollansatz mit derselben Zellsuspension liefert die Bezugswerte. Die Inkubation erfolgt im Wasserbad (37°C) unter Luftzutritt und langsamem Rühren mit einem Teflonquirl. Die Gesamtinkubationsdauer beträgt maximal 120 Minuten. Zur Bestimmung des Thymidin-, Desoxyuridin- und Uridineinbaus gibt man 0,1 µCi der entsprechenden markierten Substanz in ein Zentrifugenglas und pipettiert 20 Minuten vor der gewünschten Meßzeit je 1 Milliliter der Zellsuspension in diese so vorbereiteten Zentrifugengläser. Diese werden im Schüttelthermostaten inkubiert, mit eiskalter Ringer-

lösung gestoppt, die Zellen bei 1000 g abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und der Rückstand mit 8 ml 5%-iger Trichloressigsäure aufgerührt. Nach 30 Minuten im Eisbad wird mit 15000 g (4°C, 10 Min.) zentrifugiert, der Niederschlag in 4 ml eiskalter Trichloressigsäure (5 %) resuspendiert und mit einer Wasserstrahlpumpe auf einem Membranfilter abgesaugt, wobei mehrmals mit Trichloressigsäure (5 %) nachgespült wird. Die Aktivitätsmessung erfolgt im Flüssigkeitsscintillationszähler mit Toluolscintillator.

b. Solide Malignome des Menschen

Solide Malignome des Menschen werden sofort nach der operativen Entfernung aufgearbeitet. Tumoren weicher Konsistenz werden durch ein Teesieb (Maschenweite 600-700 µm) gedrückt und in Pufferglukose-Lösung (Krebs-Ringer-Phosphatpuffer; pH 7,32; Glukose 300 mg/100 ml) bei 0° C suspendiert. Die Gewebspartikel werden bei 0° C abzentrifugiert (1000 g) und der Überstand verworfen; danach Suspension im Inkubationsmedium (Nährmedium nach LIMBURG (15), versetzt mit Cephalotin (100 µg/ml Endkonzentration)). Nach dem Anfärben mit einem Vitalfarbstoff (z.B. Eosin) wird der Anteil der toten Gewebsanteile unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus dieser Suspension werden je 1 Milliliter in Zentrifugengläser pipettiert, die je Gläschen 0,1 µCi einer der Markierungssubstanzen enthalten. Die Inkubation erfolgt im Schüttelthermostaten bei 37° C über 60 Minuten. Die Inkubationsröhrchen werden mit Carbogen begast. Der pH-Wert wird ständig überprüft und bei pH 7,32 gehalten. Nach 60 Minuten werden die Ansätze auf 0° C abgekühlt und zweimal mit eiskalter Ringerlösung gewaschen. Nach Zugabe von je 5 ml 5%-iger eiskalter Trichloressigsäure werden die Proben bei maximaler Umdrehungszahl des Ultraturrax im Eisbad homo-

genisiert. Danach bleiben die Ansätze eine Stunde im Eisbad stehen. Der Niederschlag nach dem Zentrifugieren (15000 g, 4° C, 10 Min.) wird in 1 ml Soluene aufgenommen und bei 45° C gelöst. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur fügt man 5 ml Toluolscintillator und 5 ml Dimilume-30 zu. Die Aktivitätsmessung erfolgt im Flüssigkeitsscintillationszähler.

Die Einbauraten werden auf 1 µg DNA pro Ansatz berechnet. Dazu erfolgt die DNA-Konzentrationsbestimmung nach BURTON (16).

C. Messung der Einbauraten von ^{14}C-Adenin, ^{14}C-Cytidin und ^{14}C-Uridin getrennt in die DNA und RNA von Ascites-Tumorzellen und soliden Malignomen des Menschen

Die Markierung und Aufarbeitung erfolgt zunächst wie unter II,2,B,a und b beschrieben. Der mit Trichloressigsäure gefällt Niederschlag wird mit 0,2 N Natronlauge über 15 Stunden bei 37° C unter langsamem Schütteln hydrolisiert. Danach wird die DNA und ein Großteil der Proteine durch konz. Salzsäure bei 0° C und pH 1 ausgefällt und abzentrifugiert (15000 g, 4° C, 10 Min.). Der Niederschlag wird noch zweimal in 0,2 N Natronlauge aufgenommen und mit Salzsäure ausgefällt. Darauf wird das Sediment lyophilisiert und in 1 ml Soluene gelöst. Wenn alle Partikel gelöst sind, gibt man 10 ml Toluolscintillator hinzu und mißt die Aktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler. Die Impulse pro Minute entsprechen den Einbauraten ^{14}C-markierter Nuoleoside in die DNA.

Der Überstand von der ersten DNA-Fällung wird in 10 ml Insta-Gel suspendiert und die Aktivität s.o. gemessen. Die Werte entsprechen den Einbauraten in die RNA.

D. Bestimmung der Aktivität der Ribonucleosid-diphosphatreduktase im zellfreien System von Ascites-Tumorzellen und soliden Geweben

a. Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen

Ehrlich-Ascites- Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen werden gesammelt, gewaschen und bei 1000 g gepackt (4° C, 10 Min.). Je Milliliter gepackter Zellen fügt man das doppelte Volumen eiskalter physiologischer Kochsalzlösung zu und suspendiert die Zellen. Im Eisbad wird die Zellsuspension bei maximaler Umdrehungszahl des Ultraturrax 3x30 Sekunden lang homogenisiert und sofort darauf abzentrifugiert (15000 g, 4° C, 5 Min.). Der überstehende Gewebsextrakt wird in einer Ultrazentrifuge nochmals zentrifugiert (100 000 g, 4° C) und nach einer Stunde in einem Eisbad zwei Stunden gegen 0,02 M Trishydroxyäthylaminomethanpuffer (pH 7) dialysiert. Danach fügt man dem Dialysat in kleinen Portionen so lange eiskalte 0,5 M Essigsäure zu, bis ein pH-Wert von 5,2 erreicht ist. Man rührt noch weitere 2 Minuten und zentrifugiert dann ab (3000 g, 4° C, 2 Min.). Der Überstand wird verworfen, während das Präzipitat in eiskaltem Trishydroxyäthylaminomethanpuffer (0,05 M, pH 8) gelöst und zur Säulenchromatographie verwendet wird. Alle Manipulationen während der pH 5,2-Fällung müssen rasch ausgeführt werden, da die Ribonucleosid-diphosphatreduktase unter diesen Bedingungen instabil ist.

DEAE-Cellulose-23SH wird mit dest. Wasser angeschlämmt und durch wiederholtes Dekantieren von kleinen Partikeln befreit. Man packt damit eine Chromatographiesäule, deren Höhe

etwa das Eineinhalbfache des Durchmessers beträgt. Die gepackte Säule wäscht man mit 5 Liter 1%-iger Natronlauge und spült mit dest. Wasser gründlich nach. Vor dem Gebrauch wird sie mit 0,04 M Phosphatpuffer (Puffer II,1,G,a) äquilibriert. Allen Pufferlösungen wird als Oxydationsschutz Mercaptoäthanol -500 µl/l- zugesetzt.

Ehe der Enzymextrakt nach der pH 5,2-Fällung der Säule aufgetragen wird, werden nicht gelöste Partikel abzentrifugiert (15000 g, 4° C, 5 Min.). Den Überstand trägt man der Säule auf, wäscht kurz mit 0,04 M Phosphatpuffer nach und chromatographiert aufsteigend mit 0,075 M Phosphatpuffer (Puffer II,1,G,b). Die Elution wird so lange fortgesetzt, bis die Extinktion einen Wert von 0,02 bei einer Wellenlänge von 270 nm erreicht hat. Bei dieser Eiweißkonzentration wechselt man den Puffer gegen Puffer II,1,G,c (1,3 M) aus und eluiert wiederum so lange, bis die Extinktion 0,02 beträgt (s. Abb. 9). Die Fraktionen nach dem letzten Pufferwechsel enthalten die Ribonucleosiddiphosphatreduktase, die gesammelt und im Eisbad nach dem Sättigen mit Ammoniumsulfat noch eine halbe Stunde gerührt werden. Das ausgefallene Proteingemisch wird abzentrifugiert (9000 g, 4° C, 1 Min.) und in 0,02 M Trishydroxyäthylaminomethanpuffer (pH 7, ohne Zusatz von Mercaptoäthanol) gelöst. Die noch stark salzhaltige Proteinlösung dialysiert man eine Stunde gegen dest. Wasser (Eisbad) und konzentriert sie dann im Ultrafiltrationssystem mit Bio-Fiber 50.

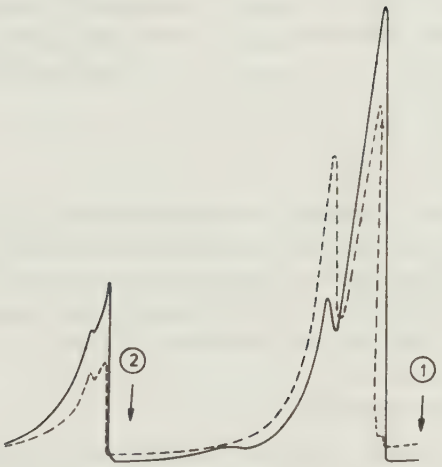


Abb. 9: Elutionsprofil von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen an DEAE-Cellulose.
(Säulenhöhe 5,5 cm, Durchmesser 4,5 cm, aufgetragen wurden 15 ml, 21 mg Protein/ml;
1 = Puffer II,1,G,b
2 = Puffer II,1,G,c
Elutionsrichtung von rechts nach links
——— = Elution bei 270 nm
– – = Elution bei 310 nm).
Die Elutionskurve bei 2 wurde mit 10-facher Ordinatendehnung aufgezeichnet.

Chromatographie des an DEAE-Cellulose gereinigten Zellextraktes an DEAE-Sephadex

Eine gekühlte Säule (1,5 cm Durchmesser, 90 cm Höhe) wird mit vorgequollenem Sorbens gepackt und mit Magnesium-Tris-Puffer (Puffer II,1,G,d) äquilibriert.

Nachdem die Proteinlösung aufgetragen worden ist, wird mit einem Magnesium-Tris-NaCl-Gradienten-Puffer (Puffer II,1,G,d + Puffer II,1,G,e)

bei 4^{o} C eluiert. Die Ribonucleosiddiphosphatreduktase wird in dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Elutionsberg eluiert (Abb. 16). Die Konzentration erfolgt durch Ultrafiltration mit Bio-Fiber 50.

Proteinbestimmung

Als Maß der Proteinkonzentration dient die Extinktionsdifferenz zwischen 310 nm und 270 nm. Die Proteinkonzentrationen werden auf Rinderserum bezogen und zeigen Übereinstimmung mit der von LOWRY angegebenen Methode (17).

Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivitätsbestimmung beruht auf der Reduktion von Ribonucleosiddiphosphat zu Desoxyribonucleosiddiphosphat. Man fügt dem Testgemisch ein markiertes Ribonucleotid zu (z.B. ^{14}C-CDP) und zählt den prozentual reduzierten Anteil aus. Die Erfassunggrenze liegt bei 10^{-2} nMol.

Testmischung

ATP	8,0 mM
Mg^{2+}	8,0 mM
NaF	16,0 mM
$FeCl_3$	0,1 mM
Dithioerythrit	12,4 mM
Nucleosiddiphosphat	0,4 mM
K_2HPO_4	80,0 mM

Wenn cytocide Substanzen appliziert werden, werden diese in dest. Wasser gelöst und mit KH_2PO_4 oder K_2HPO_4 auf den pH-Wert des Inkubationsmediums (pH 7,1) gebracht. Dem Testgemisch (500 µl) fügt man im Eisbad 0,2 µCi ^{14}C-Ribo-

nucleosiddiphosphat, das Enzym (100 µl, 0,01-0,06 mg/ml) und die gelöste Testsubstanz zu und füllt darauf das Volumen mit dest. Wasser zu 1000 µl auf.

Die Reaktion wird im Schüttelwasserbad bei 37° C gestartet und nach 10 Minuten durch Zugabe von 100 µl 10%-iger Trichloressigsäure beendet. Ein Aliquot des Reaktionsgemisches trägt man auf einer PEI-imprägnierten Cellulose-Dünnschichtplatte punktförmig auf und chromatographiert zweidimensional wie unter II,2,A,a,γ) angegeben. Die strahlungsaktiven Bezirke werden in der Birchover-Isotopencamera lokalisiert und auf die DC-Platte zurückprojiziert (Abb. 10).

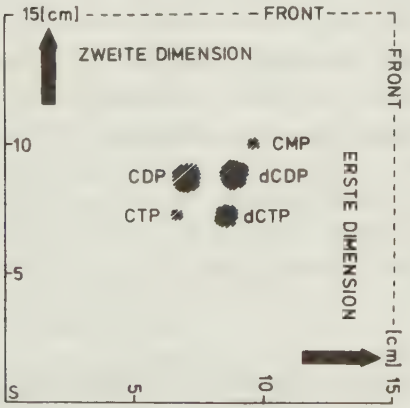


Abb. 10: Radiochromatographische Lokalisierung von Cytidin- und Desoxycytidindiphosphat (CDP, dCDP), Cytidinmonophosphat (CMP), Cytidin- und Desoxycytidintriphosphat (CTP und dCTP), nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie.

Die mit einem weichen Bleistift markierten Celluloseschichten kratzt man mit einem Spatel ab und überführt sie in ein Scintillations-

fläschchen. Nach Zugabe von je 10 ml Toluolscintillator wird die Impulszahl pro Minute im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen.

Alle radioaktiven Messungen werden um die Impulszahl einer gleich großen nicht strahlenden Fläche korrigiert und auf den Faktor 0,2 der Fluoreszenzlöschung (Quench) bezogen.

Als Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase wird die Menge Desoxyribonucleosiddiphosphat bezeichnet, die von 1 mg Protein in 10 Minuten gebildet wird.

b. Enzymextraktion aus soliden Geweben

Die Tumoren werden wie auch die regenerierende Rattenleber sofort nach der Exstirpation aufgearbeitet.

Man befreit die Gewebe mit einem Skalpell von anhaftendem Bindegewebe und evt. nekrotischen Bezirken.

Nach mechanischer Zerkleinerung (s. Methode II,2,A,b, α oder ß) werden sie mit dem doppelten Volumen eiskalter Ringerlösung übergossen und bei maximaler Umdrehungszahl des Ultraturrax unter Eiskühlung homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie unter II,2,D,a angegeben.

c. Regenerierende Rattenleber/partielle Hepatektomie

Die partielle Hepatektomie (2/3-Hepatektomie) wurde an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Operation erfolgte unter Äthernarkose nach der von HIGGENS und ANDERSON angegebenen Methode (1931).

III. ERGEBNISSE

1. Quantitative Messungen der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphatkonzentrationen

Vorangegangene Experimente zeigten, daß eine direkte optische Auswertung der DC-Platten wegen einer Fluoreszenzlöschung durch saure Laufmittel nicht erfolgen kann. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, werden Acetatpuffer als Laufmittel verwendet, die eine quantitative Auswertung ohne vorherige Elution gestatten (s. Methode II,2,A,a,ß).

Da zur endgültigen Trennung der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate auf PEI-Cellulose möglichst protein- und salzarme Lösungen verwendet werden sollen, wurde auf die Reinigung des nucleotidhaltigen Gewebsextraktes besonders geachtet.

Wenn kleinste Lösungsmittelmengen eingesetzt werden, erfolgen außer pH-abhängigen Fällungen am isoelektrischen Punkt auch Fällungen von Eiweiß durch Aussalzen. Die Identifizierung der getrennten Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate (Abb. 15) erfolgte durch

Referenzsubstanzen (gleiche Rf-Werte im Gemisch),
UV-Spektren (Abb. 11),
Fluoreszenzspektren (Abb. 12) und durch
IR-Spektren (Abb. 13 und 14).

Die Berechnungen zur Ausbeutebestimmung sind in Tafel 1 angegeben, und man findet bei hohen Ribonucleotidkonzentrationen einen überproportionalen Analysenfehler. Gute Ergebnisse sind bei mittleren Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphatkonzentrationen zu erzielen.

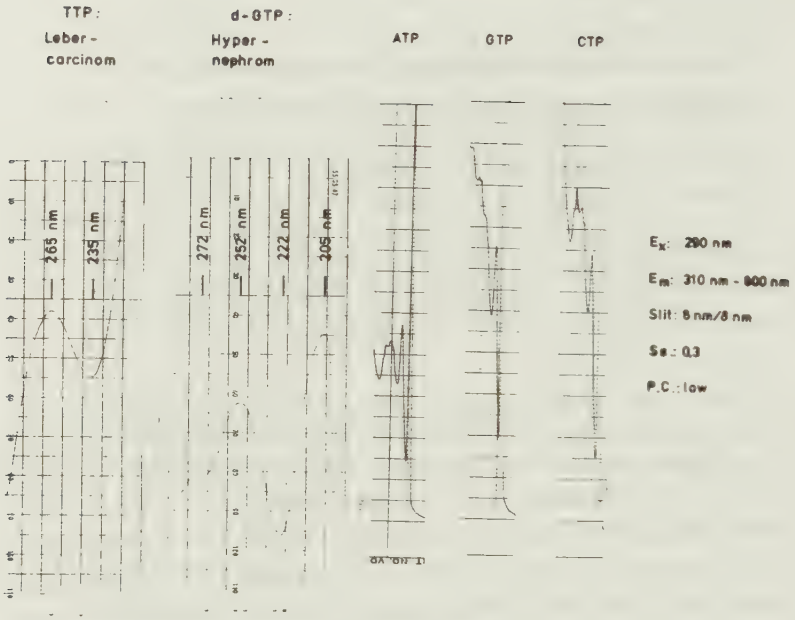


Abb. 11: UV-Spektren isolierter Ribonucleotide, dTTP und dGTP stehen stellvertretend für alle anderen Ribonucleotide. Charakteristische Minima und Maxima sind durch Angabe der Wellenlänge bezeichnet. Die Spektren wurden bei pH 1 aufgenommen und zeigen mit den in der Literatur (18) angegebenen Übereinstimmung.

Abb. 12: Die Fluoreszenzspektren wurden im Fluorimeter (Perkin-Elmer MPF3) aufgenommen. Bei konstantem Erregerlicht (E_x) wird die Intensität des Emissionslichtes (E_m) aufgezeichnet.

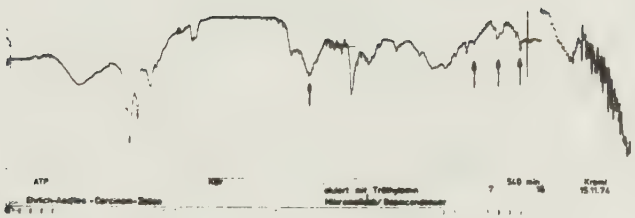


Abb. 13: Das Infrarotspektrum zeigt erhebliche Verunreinigungen im Bereich von 3500 cm^{-1}. Charakteristische Banden, beweisend für ATP, sind mit Pfeilen gekennzeichnet und in Abb. 14 mit 5-facher Ordinatendehnung wiedergegeben.

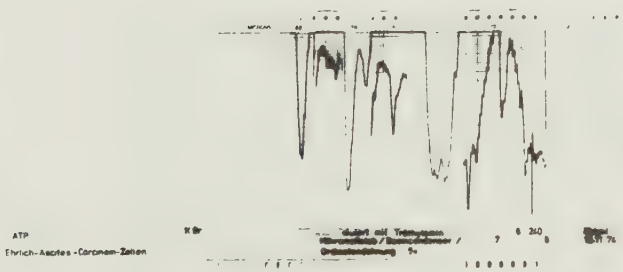
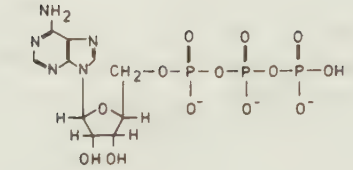
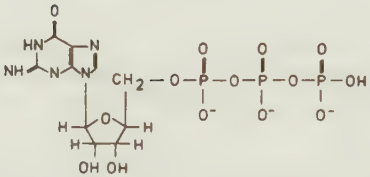


Abb. 14: Die Banden zeigen Übereinstimmung mit einem Referenzspektrum, das mit einem Gemisch aus Polyäthylenimin und ATP aufgenommen wurde.

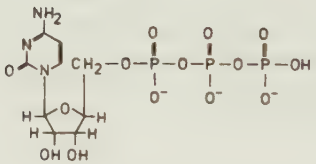
Adenosintri-phosphat



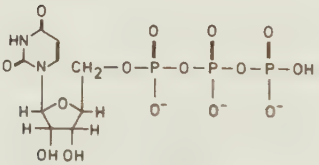
Guanosintri-phosphat



Cytidintri-phosphat



Uridintri-phosphat



Thymidintri-phosphat syn. d-Thymidintri-phosphat

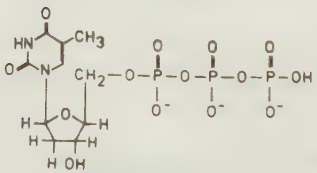


Abb. 15: Strukturformeln von Ribonucleosidtriphosphaten und von Desoxythymidintriphosphat. Die korrespondierenden Desoxyverbindungen sind am C_2 reduziert. (Position C_2', siehe Abb. 2).

	zugegebene Testsubstanz		Ausbeutebestimmung nach NH_3-Fällung		nach Kieselgel-chrom.		nach PEI.-Chrom.		mittlere Ausbeute in %	
	ATP Mol^{-9}	UTP Mol^{-9}	ATP Mol^{-9}	UTP Mol^{-9}	ATP Mol^{-9}	UTP Mol^{-9}	ATP Mol^{-9}	UTP Mol^{-9}	ATP	UTP
Versuch 1	1	1	0,7	1,-	0,7	0,8	0,5	0,6		
	1	1	1,2	1,-	0,8	0,9	0,7	0,7		
Versuch 2	30	30	27	26	27	25	25	24	83	80
	30	30	26	26	26	26	25	24		
Versuch 3	50	50	41	42	41	41	32	30	63	59
	50	50	40	33	40	39	31	30		

Tafel 1: Ausbeutebestimmung

In der linken Spalte sind die in einem fiktiven Gewebsextrakt enthaltenen Ribonucleotide (ATP und UTP/je Ansatz) angegeben. Die Konzentrationsmessungen nach der NH_3-Fällung (s. Methode II,2,A,a,α) und der Chromatographie auf Kieselgel (s. Methode II,2,A,a,ß) wurden UV-photometrisch durchgeführt. Bei Bestimmungen mit 1 nMol Ribonucleotid pro Ansatz wurden die Konzentrationen nach der Chromatographie auf PEI-Cellulose (s. Methode II,2,A,a,γ) durch Eluieren ermittelt. Alle weiteren Konzentrationsmessungen erfolgten im TLC-Fluoreszenzscanner. Rechts außen ist die Ausbeute nach der Chromatographie auf PEI-Cellulose in % angegeben.

VER-SUCH	KONZENTRATION (nMol/g ZELLEN)							
	ATP	GTP	CTP	UTP	dATP	dGTP	dCTP	dTTP
I 4 TAGE	3400	210	60	40	13	8	6	4
II 7 TAGE	3000	140	40	20	10	4	4	3
III 10 TAGE	2800	130	30	30	8	4	2	2

Tafel 2: Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphatkonzentrationen in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen bei unterschiedlichem Transplantationsalter

HISTOLOGIE d. Tumor.	KONZENTRATION (nMol/g ZELLEN)								IMPULSE / MINUTE
	ATP	GTP	CTP	UTP	dATP	dGTP	dCTP	dTTP	
Leberzellcarcinom	600	100	50	40	18	10	10	2,5	$50 \cdot 10^3$
Wilms' Tumor	90	50	20	10	5	4	4	1	$50\ 10^3$
Cystadenocarcinom d. Ovars	160	100	10	5	2	2	2	1	$20 \cdot 10^3$
Neuroblastom	80	40	10	10	5	4	4	1	$20 \cdot 10^3$
Melanoma maligna	80	10	5	10	-	-	-	-	$15 \cdot 10^3$
Lymphogranulomatos.	30	10	5	<5	2	1	0,5	0,5	$10 \cdot 10^3$
Adenocarcinom des Colons	50	10	10	10	-	-	-	1	$10 \cdot 10^3$
Plattenepithelcarcin.	15	5	<5	5	-	-	-	0,5	$5 \cdot 10^3$
Hypernephrom	10	8	<5	-	3	1	1	-	$2 \cdot 10^3$

Tafel 3: Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphatkonzentrationen in soliden menschlichen Tumoren unterschiedlich klinisch faßbarer Wachstumsrate. In der Spalte rechts außen ist der ^{14}C-Thymidineinbau in Gewebspartikel dieser Tumoren in Impulsen pro Minute pro 10 mg Protein angegeben (19).

Als Ausgangsmaterial einer quantitativen Analyse der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate genügen 200 mg gepackter Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen. Wenn Gewebe mit geringer Proliferationsrate untersucht werden sollen, steigt die notwendige Materialmenge an.

Die Ergebnisse von drei quantitativen Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphat-Konzentrationsmessungen von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen von unterschiedlichem Transplantationsalter sind in Tafel 2 zusammengefaßt.

Der Vergleich der Ribonucleosidtriphosphate mit den Desoxyribonucleosidtriphosphaten weist ein relativ konstantes molares Verhältnis auf, wobei die ATP-Konzentration die der anderen Ribonucleotide erheblich übersteigt.

Der ATP-Gehalt sinkt mit Zunahme des Transplantationsalters der Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen ab.

Der Vergleich von Transplantationstumoren mit soliden Malignomen des Menschen zeigt, daß insbesondere der ATP-Spiegel der Zellen eng korreliert ist mit der klinisch sichtbaren Wachstumsrate (Tafel 3).

2. Messungen an intakten Zellen zur Ribonucleosiddiphosphatreduktion

Durch Untersuchungen an intakten Zellen lassen sich nur wenig Anhaltspunkte über die Ribonucleosiddiphosphatreduktion gewinnen. Bei Markierung von Zellen und Gewebspartikeln in vitro mit ^{14}C-Cytidin, ^{14}C-Uridin und ^{14}C-Adenin wurde der Anteil der in die DNA und der in die RNA eingebauten Markierungssubstanz bestimmt (Tafel 4). In Ehrlich-Ascites-Carcinom- und in Yoshida-Ascites-Sarkomzellen liegt der Anteil des

markierten Ribonucleotids, umgewandelt durch die Ribonucleosiddiphosphatreduktase und eingebaut in die DNS bei ein bis zwei Prozent. Entsprechend ist eine dünnschichtchromatographische Trennung von ^{14}C-Cytidintriphosphat und ^{14}C-Desoxycytidintriphosphat bei Cytidinmarkierung nicht exakt möglich, da sich im Radiochromatogramm die Ribonucleosidtriphosphate mit den Desoxyribonucleosidtriphosphaten überlappen.

	Markierung der Zellen/ Gewebspartikel mit		
	^{14}C-Uridin 2×10^{-6} mol.	^{14}C-Cytidin 2×10^{-7} mol.	^{14}C-Adenin 2×10^{-6} mol.
Ehrlich-Ascites-Carcinom 5 Tage nach Überimpfung n=2	1,5	2,5	1,5
Yoshida-Ascites-Sarkom 10 Tage nach Überimpfung n = 2	1,0	1,5	1,5
infiltrierend wachsendes Thymom n = 2	4,5	6,0	5,5
Adenocarcinom d. Magen-darmtraktes n=1	5,0	8,0	10,0
entdifferenziertes Harn-blasencarcinom n=1	2,0	10,0	3,0
teils solides, teils tra-bekuläres Schilddrüsencar-cinom n=1	7,0	22,0	1,0

Tafel 4: Anteil in Prozent der in die DNA eingebauten Markierungssubstanz (= 100 %) bei Markierung von Ascites-Tumorzellen (Inkubationsdauer 20 Minuten) und Tumorgewebspartikeln (Inkubationsdauer 60 Minuten) in vitro (s. Methode II,2,C).

In malignen Tumoren des Menschen ist der Anteil des in die DNA eingebauten Ribonucleotids größer als in Ascites-Tumorzellen, jedoch nur in Einzelfällen, wie z.B. bei dem in der Tabelle aufgeführten Schilddrüsencarcinom (25 %) und ^{14}C-Cytidintriphosphat (75 %) bei Cytidinmarkierung dünnschichtchromatographisch faßbar. Es ist daher nicht gelungen, an intakten Zellen Aufschluß über Hemmechanismen der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase zu gewinnen.

3. Messung der Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase im zellfreien System

A. Allgemeine Eigenschaften der Ribonucleosiddiphosphatreduktase

Die Experimente zeigten, daß Aktivitätsbestimmungen mit Rohextrakten (100 000 g Überstand) nur bei Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen möglich sind, während bei menschlichen Tumoren keine Reduktion zu beobachten ist.

Daher wurde zu allen weiteren Untersuchungen ein über DEAE-Cellulose gereinigtes Cytolysat (s. Methode II,2,D,a) verwendet, falls nicht anders vermerkt.

Die weitere Prüfung auf Reinheit des über DEAE-Cellulose gereinigten Cytolysats an DEAE-Sephadex zeigte noch Verunreinigungen an (Abb. 16). An begleitenden Enzymen konnten im einzelnen nachgewiesen werden:

Adenosindiphosphatkinase
Desoxycytidindiphosphatkinase
Thymidylatsynthetase.

Die Untersuchungen der Reduktionsarten mit verschiedenen Ribonucleosiddiphosphatreduktasen in Anhängigkeit der Zeit ist in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Das Temperatur- und pH-Optimum der Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen liegt bei 41° C bzw. pH 7,1 (Abb. 18 und 19).

Die Reduktionsgeschwindigkeit (1/v) von Cytidindiphosphat zu Desoxycytidindiphosphat bei steigendem Substratangebot im Medium wurde untersucht und doppelt reziprok aufgetragen (Abb. 20). Das Aktivitätsmaximum liegt bei 0,8 mM Cytidindiphosphat, und man sieht einen nichtlinearen Verlauf.

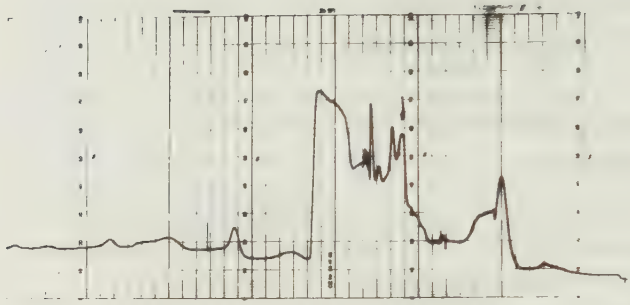


Abb. 16: Die Ribonucleosiddiphosphatreduktase befindet sich in dem mit einem Pfeil bezeichneten Absorptionsmaximum. Die Elution erfolgte von rechts nach links. (DEAE-Sephadex; s. Methode II,2,D,a; Säulendurchmesser 1,5 cm; Säulenlänge 95 cm; 275 nm Wellenlänge; aufgetragen wurden 4 mg Protein; 2 mg/ml; 4° C).

Dies ist auf eine Veränderung der Tertiärstruktur (allosterische Hemmung) zurückzuführen (20). Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt $2{,}5 \times 10^{-4}$ für die Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen bei Verwendung von Cytidindiphosphat als Testsubstrat.

Die vergleichende Bestimmung der ADP-, GDP- und CDP-Reduktion wurde mit einem über DEAE-Cellulose gereinigten Enzymextrakt durchgeführt (Abb. 21a und b). Die Bestimmung der Reduktionsgeschwindigkeit von UDP zu dUDP mit dem über DEAE-Cellulose gereinigten Cytolysat war nicht möglich, da begleitende Nebenreaktionen die Messungen störten. Daher wurde der zusätzlich über DEAE-Sephadex gereinigte Enzymextrakt für diese Bestimmung eingesetzt.

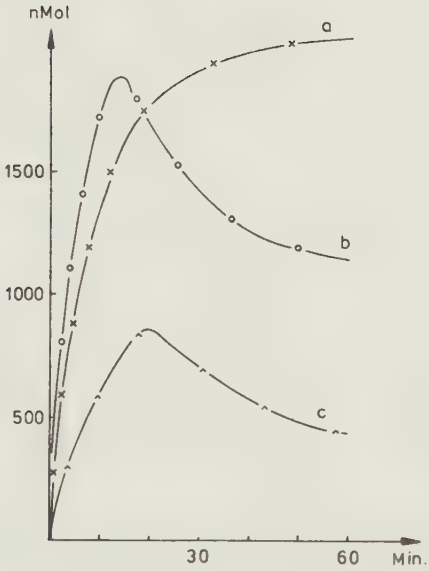


Abb. 17: Spezifische Aktivität der Ribonucleosid-diphosphatreduktase

Auf der Ordinate ist die Desoxycytidin-diphosphatmenge aufgetragen, die von einem Milligramm Enzym in Abhängigkeit von der Zeit gebildet wird. Später vorgenommene Kontrolluntersuchungen ergaben, daß bei der Enzymzubereitung C ein 50%-iger Verlust der Aktivität eingetreten ist. Die spezifische Aktivität der Yoshida-Reduktase ist daher gleich der Aktivität der Ehrlich-Ascites-Carcinom-Reduktase.
(a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase der regenerierenden Rattenleber
b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen
c = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen).

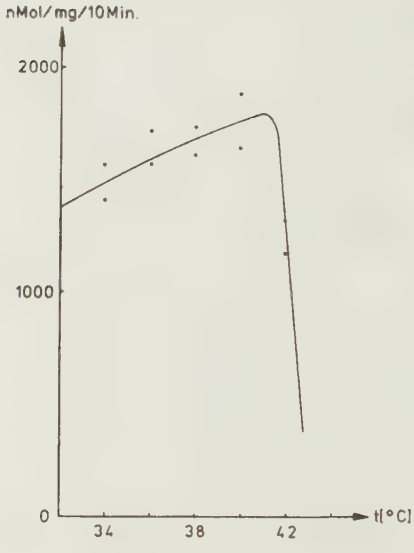


Abb. 18: Temperatur-Optimum der Reduktion von Cytidindiphosphat.

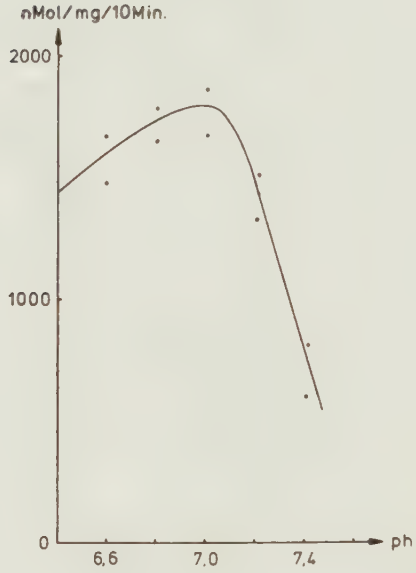


Abb. 19: pH-Optimum der Cytidindiphosphat-reduktion.

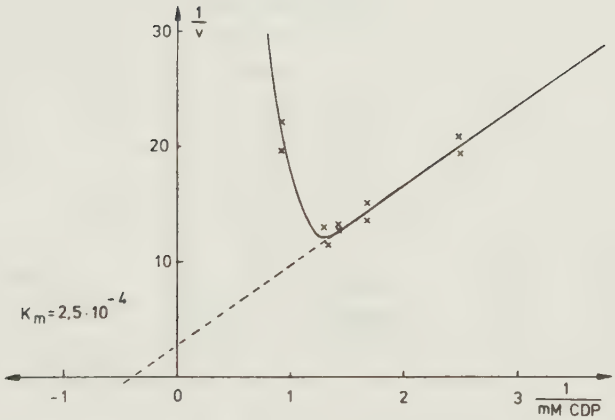


Abb. 20: Reduktionsgeschwindigkeit der Cytidindiphosphatreduktion in Abhängigkeit vom Substratangebot im Medium. (Inkubationsdauer 10 Min., 0,045 mg Protein/Ansatz).

Auf Grund der größeren Reinheit findet man eine etwa doppelt so hohe Reduktionsrate (Abb. 21a und b).

Wird die Ribonucleosiddiphosphatreduktase-Konzentration in der regenerierenden Rattenleber als Funktion der Zeit nach der Operation aufgezeichnet, so ergibt sich eine Konzentrationskurve mit einem Maximum bei 48 Stunden (Abb. 22a). Zur gleichen Zeit tritt bereits eine deutliche Verlangsamung der Regenerationsgeschwindigkeit ein (Abb. 22b).

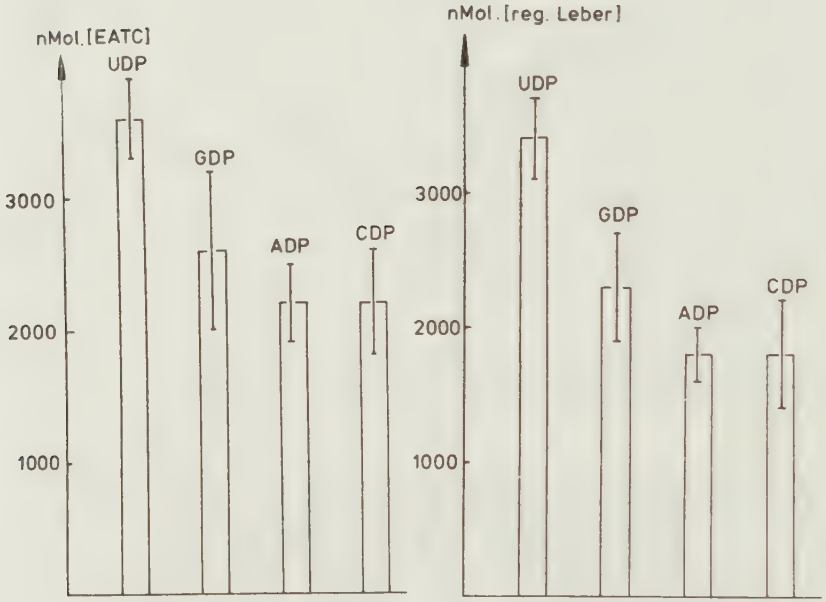


Abb. 21 a und b: Vergleich der Reduktaseaktivität (nMol/mg Protein/10 Min.) von Enzymextrakten aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und regenerierender Rattenleber. Die Untersuchungen zur UDP-Reduktion wurden mit einem zusätzlich über DEAE-Sephadex gereinigten Enzymextrakt durchgeführt (s. Methode II,2,D,a). Als Aktivität des an DEAE-Sephadex gereinigten Enzyms wird die Menge dUDP bezeichnet, die von 1 mg Enzym in 10 Minuten gebildet wird.

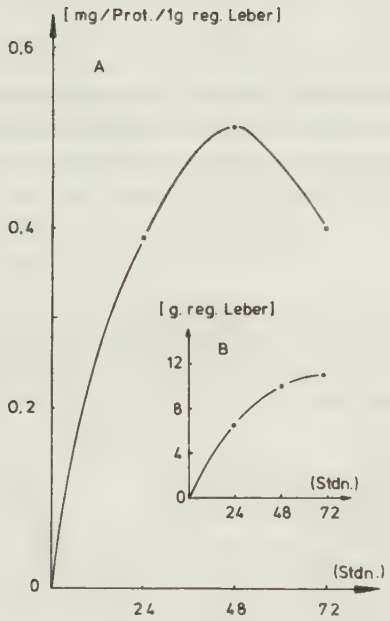


Abb. 22A: Ribonucleosiddiphosphatreduktase-Konzentration in der regenerierenden Rattenleber. Die Quantifizierung der Enzymmenge erfolgte nach DEAE-Cellulose-Chromatographie durch Extinktionsdifferenzmessung (II,2,D,a).

Abb. 22B: Gewicht der neugebildeten Leber. Das verbleibende Leberdrittel nach 2/3-Hepatektomie wurde rechnerisch berücksichtigt.

B. Hemmung und Stimulierung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase durch allosterische Effektoren

Reduktion von ADP

Die Reduktion aller vier Ribonucleosiddiphosphate wird durch ATP als positiver Effektor stimuliert (21). Abbildung 23a und b zeigen Hemmung und Stimulierung der enzymatischen Reduktion von ADP zu dADP durch die Desoxyribonucleosidtriphosphate.

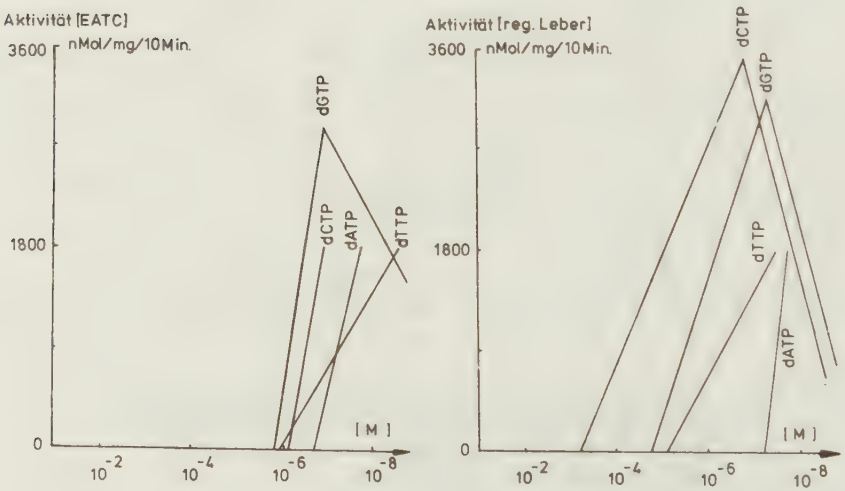


Abb. 23a und b: Der Einfluß der Desoxyribonucleosidtriphosphate (10^{-8}M bis 10^{-3} M) auf die ADP-Reduktaseaktivität von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und der regenerierenden Rattenleber. (Bestimmung der Enzymaktivität s. Methode II,2,D,a).

dATP und dTTP hemmen in beiden Enzymsystemen die Reduktion von ADP, wobei die Ribonucleosiddiphosphatreduktase der Rattenleber durch dATP bei geringerer Effektorkonzentration blockiert wird. Während dGTP im Ehrlich-Ascites-Carcinom- und regenerierendem Rattenlebersystem als positiver Effektor fungiert, beschleunigt dCTP die Reaktion ausschließlich bei der regenerierenden Rattenleber.

Reduktion von CDP

Wie man Abbildung 24a und b entnehmen kann, wird die Reduktion durch keinen der untersuchten Effektoren stimuliert, sondern nur gehemmt, wobei aber die Inhibition durch dGTP in unphysiologisch hoher Konzentration erfolgt.

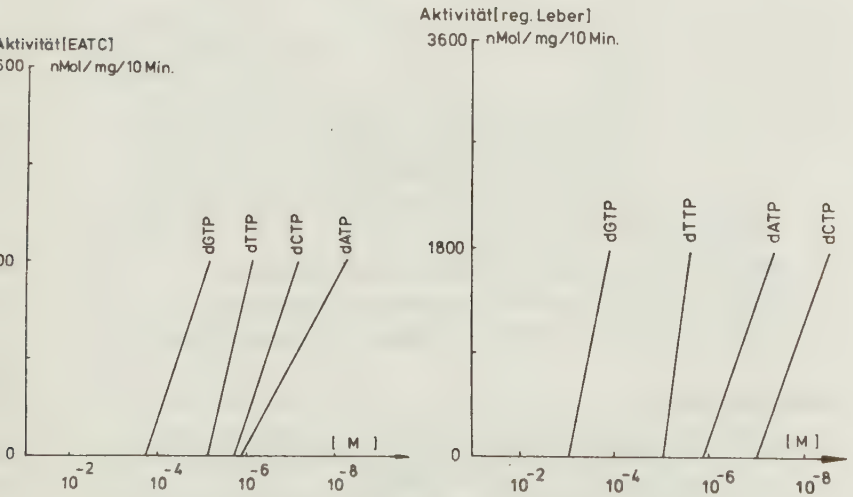


Abb. 24a und b: Der Einfluß der Desoxyribonucleosidtriphosphate (10^{-8}M bis 10^{-3}M) auf die CDP-Reduktaseaktivität von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und der regenerierenden Rattenleber (Bestimmung der Enzymaktivität s. Methode II,2,Da).

Reduktion von GDP

Die Zugabe von dCTP und dTTP zum Medium steigert die Reduktionsrate von GDP, wie es in Abbildung 25a und b dargestellt ist.

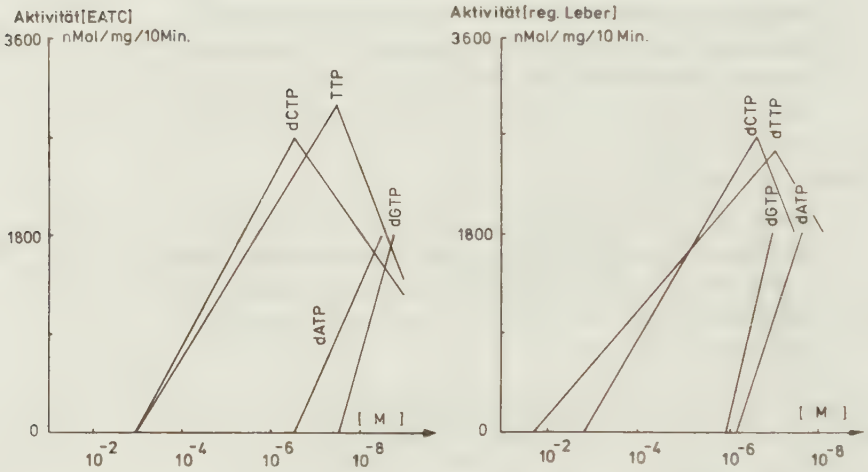


Abb. 25a und b: Der Einfluß der Desoxyribonucleosidtriphosphate (10^{-8} M bis 10^{-3} M) auf die GDP-Reduktaseaktivität von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und der regenerierenden Rattenleber (Bestimmung der Enzymaktivität s. Methode II,2D,a).

Die analogen Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP und dGTP) hemmen dagegen die Reduktion im gleichen molaren Effektorkonzentrationsbereich.

Reduktion von UDP

Die allosterische Steuerung der UDP-Reduktion ist in Abbildung 26a und b dargestellt.
In den beiden untersuchten Enzymsystemen ist eine über 50%-ige Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die Zugabe von dCTP (10^{-8} M bis 10^{-3} M)

zum Medium zu beobachten, während dTTP wie auch dATP und dGTP im System der regenerierenden Leber und bei Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen die Reduktion hemmt.

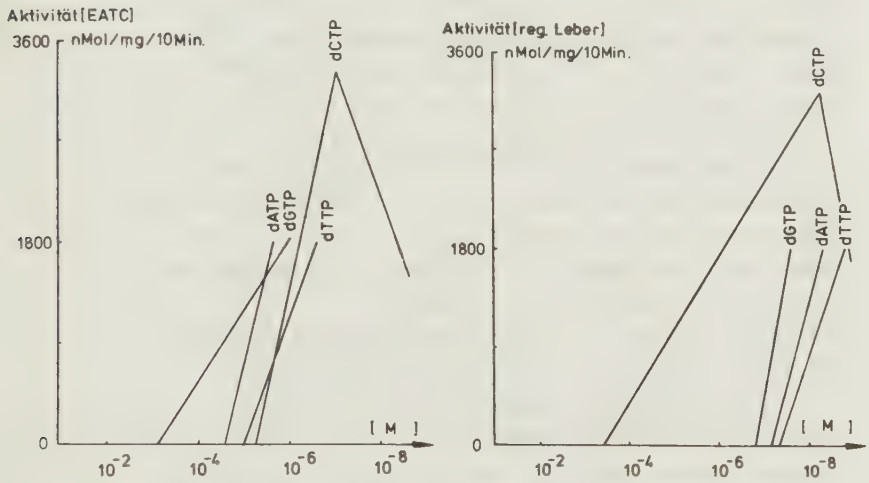


Abb. 26a und b: Der Einfluß der Desoxyribonucleosidtriphosphate (10^{-8} M bis 10^{-3} M) auf die UDP-Reduktaseaktivität von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und der regenerierenden Rattenleber. Zu diesen Bestimmungen wurde der zusätzlich über DEAE-Sephadex gereinigte Zellextrakt verwendet. Die Reduktionsraten wurden bei diesen Bestimmungen auf den über DEAE-Cellulose gereinigten Enzymextrakt bezogen (Bestimmung der Enzymaktivität s. Methode II,2,D,a).

Der Vergleich von regenerierender Rattenleber und Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen zeigt, daß die Hemmkonzentration der Effektoren bei Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen im höher molaren Bereich liegt.

C. Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase bei Applikation cytocider Substanzen

Sowohl im Hinblick auf den Wirkungsmechanismus von Cytostatika als auch aus enzymologischer Sicht erscheint es wichtig, die Aktivitätsveränderung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase bei Applikation stoffwechselaktiver Substanzen zu untersuchen. Daher wird im zellfreien Testsystem eine über DEAE-Cellulose gereinigte Enzympräparation aus menschlichen und tierischen Tumoren eingesetzt.
Dabei wird die CDP-Reduktionsrate vom unbehandelten Kontrollansatz gleich 100 % gesetzt.
Eine Aktivierung oder Hemmung nach Applikation der Testsubstanz wird in Prozenten angegeben.

a. Alkylierende Substanzen

Stellvertretend für die konstitutionell vielgestaltige Gruppe der alkylierenden Cytostatika wurde die Wirkung des Trisäthyleniminobenzochinon im Testsystem untersucht. Die therapeutische Wirksamkeit erklärt sich aus der Anwesenheit von mindestens zwei hochreaktiven funktionellen Gruppen, die an isolierter DNA (22) zu einer Quervernetzung führen können.

Bei in vitro Applikation (10^{-5} M) zeigt sich im Test eine etwa 30%-ige Verminderung der Reduktionsrate. Dabei verhält sich das aus Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Yoshida-Ascites-Sarkomzellen angereicherte Enzym nahezu gleich (Abb. 27).

Der Wirkungsmechanismus von Trisäthyleniminobenzochinon als Inhibitor der Ribonucleosiddiphosphatreduktion im Testansatz kann in einer Alkylierung des Substrates gesehen werden. In therapeutischer Konzentration (0,0026 µg/ml) sind im Testsystem keine Hemmeffekte zu erzielen.

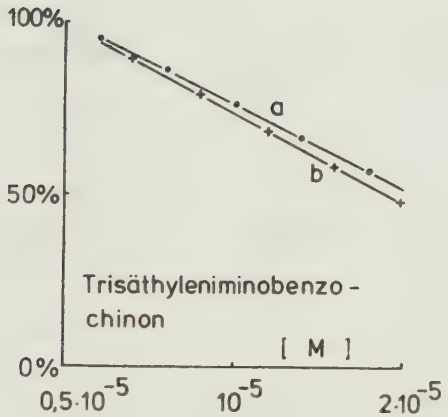


Abb. 27: Inhibitorwirkung von Trisäthyleniminobenzochinon; (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen).

b. Antibiotika mit cytostatischer Wirkung

Actinomycin C und D sind Phenoxazonderivate, die sich in den Peptidseitenketten unterscheiden. In vitro bilden Actinomycine Komplexe mit doppelsträngiger DNA (23), wenn eine Aminogruppe in Position 2 des Puringerüstes vorhanden ist. Dadurch schiebt sich der flache Heterocyclus zwischen ein Cytosin-Guanin-Paar der DNA (24).

Beide Substanzen vermindern im zellfreien System in einer Konzentration von 10^{-6} M (10^{-6} M = 1 µg/ml; therap. Dosis = 0,05 µg/ml) die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase auf ca. 70 % (Abb. 28a und b).

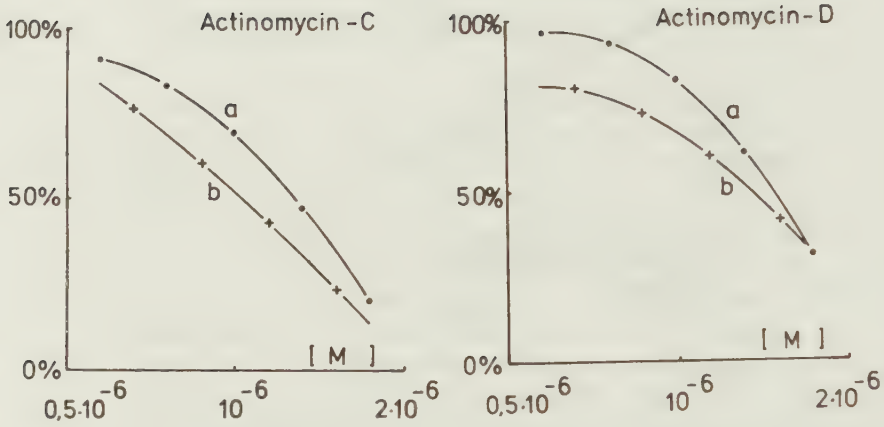


Abb. 28a und b: Inhibitorwirkung von Actinomycin C und D; (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen).

Als Erklärung dieses Hemmeffektes ist eine Komplexierung notwendiger Cofaktoren (z.B. Mg^{2+}, Fe^{3+}) in Betracht zu ziehen. Die Fluoreszenzspektren der Antibiotika zeigen bei Zugabe dieser Ionen eine Rotverschiebung (Abb. 29).

Adriamycin und Daunomycin

Adriamycin und Daunomycin haben einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie die Actinomycine, weisen jedoch das Grundgerüst der Tetracycline mit unterschiedlichem Substituenten an C_3 auf.

Im zellfreien System lassen beide Verbindungen eine ausgeprägte Inhibitorwirkung erkennen.

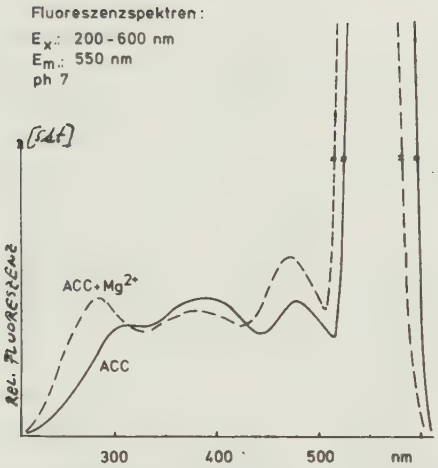


Abb. 29: Fluoreszenzspektren von Actinomycin C (durchgezogene Linie) und Actinomycin C mit Mg^{2+}-Ionen (ACC+Mg^{2+}) bei pH 7. Erregerlicht 200-600 nm, Emissionslicht 550 nm.

Bei einer Konzentration von $5x10^{-5}$ M ($5x10^{-5}$ M = 27,5 µg/ml; therap. Dosis = 7 µg/ml) wird die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase zu ca. 50 % gehemmt (Abb. 30a und b).

Dieses Ergebnis ist wohl ebenfalls Folge der ausgeprägten Komplexbildung der Tetracyclinstruktur mit zweiwertigen Metallionen. Auch hier ist eine Rotverschiebung der Fluoreszenzspektren um ca. 10 nm feststellbar (Abb. 31).

Bei Ganzzellversuchen konnte jedoch kein Hinweis für die Hemmung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase beobachtet werden.

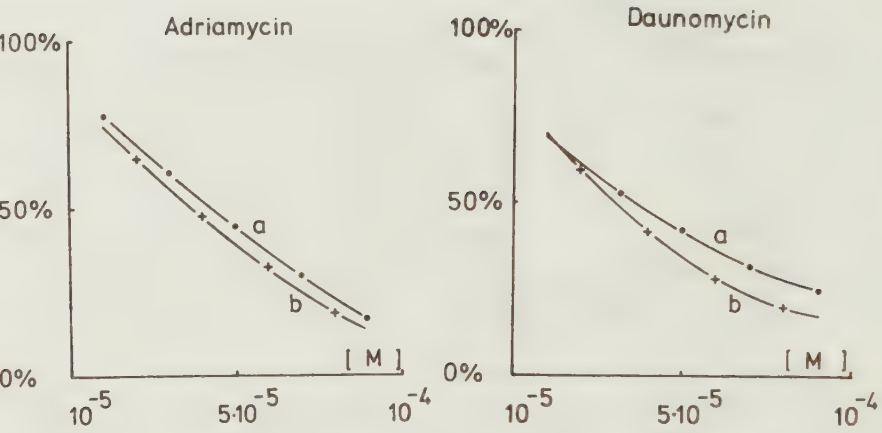


Abb. 30a und b: Inhibitorwirkung von Adriamycin und Daunomycin; (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen).

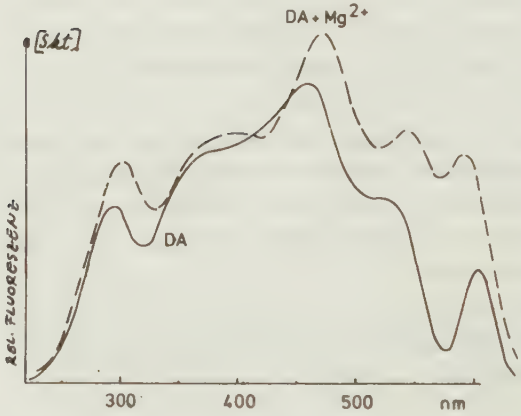


Abb. 31: Fluoreszenzspektrum von Daunomycin (durchgezogene Linie) und Daunomycin mit Mg^{2+}-Ionen ($DA+Mg^{2+}$) bei pH 7. Erregerlicht 200-650 nm, Emissionslicht 700 nm.

Bleomycin

Bleomycin wird bevorzugt zur Therapie von Plattenepithelcarcinomen eingesetzt und erhöht die Strahlensensibilität von Tumoren (25). Im Testsystem hemmt Bleomycin in einer Konzentration von $3x10^{-5}$ M ($3x10^{-5}$ M = 40 µg/ml; therap. Dosis max. 3,3 µg/ml) die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase zu 50 %. Die Hemmung ist ausgeprägter bei Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen als bei Yoshida-Ascites-Sarkomzellen (Abb. 32).

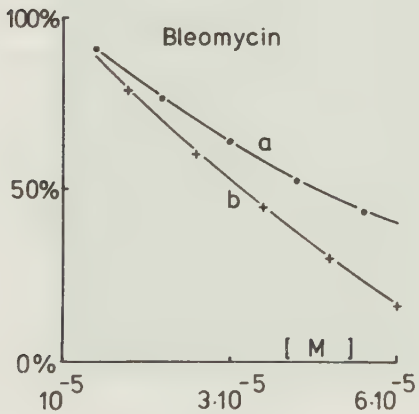


Abb. 32: Inhibitorwirkung von Bleomycin (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen).

c. Antimetabolite

Amethopterin

Amethopterin hemmt als Folsäureantagonist die Reduktion der Dihydrofolsäure. Die Verarmung an

Tetrahydrofolsäure verhindert die Methylierung von Desoxyuridin- zum Thymidinmonophosphat (26). Im Testsystem wird die Ribonucleosiddiphosphatreduktase bis zu einer Konzentration von $4x10^{-4}$ M nicht gehemmt.

5-Fluoruracil

5-Fluoruracil wird von der Zelle aufgenommen und hemmt nach Phosphorylierung zum 5-Fluoruridindiphosphat als 5-Fluordesoxyuridindiphosphat die Thymidylatsynthetase (27).

Die Umwandlung des 5-Fluoruracils zum 5-Fluoruridindiphosphat ist auch im zellfreien System wahrscheinlich, so daß eine Konkurrenz zum Testsubstrat durchaus denkbar ist.

Bei Applikation von 5-Fluoruracil ($2x10^{-4}$ M, $2x10^{-4}$ M = 26 µg/ml, therap. Dosis = 26 µg/ml) kommt es wohl über diese Konkurrenzreaktion zu einer geringfügigen Hemmung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase (Abb. 33).

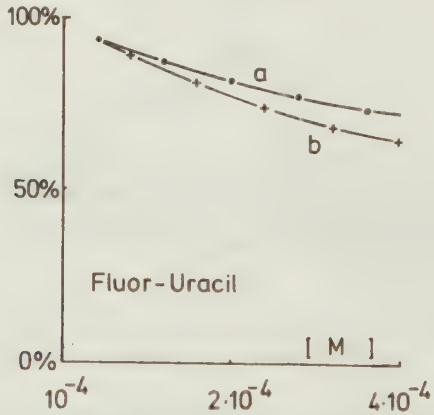


Abb. 33: Inhibitorwirkung von 5-Fluoruracil (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen).

Cytosinarabinosid

Mit ^{3}H-Cytosinarabinosid konnte im zellfreien Testsystem eine Phosphorylierung zum ^{3}H-Cytosinarabinosiddi- und Triphosphat nachgewiesen werden (Abb. 34), das als Ribonucleosiddiphosphatreduktase-Inhibitor anzusehen ist (28, 29, 30).

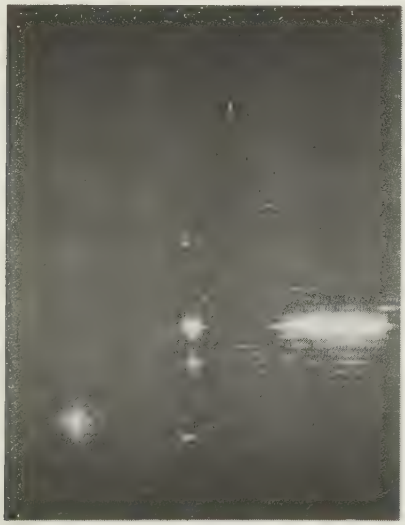


Abb. 34: Metabolisierung von Cytosinarabinosid.

Das Bild wurde mit der Birchover-Isotopencamera nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie von 200 µl Testmischung aufgenommen (erste Dimension von links nach rechts, zweite Dimension von unten nach oben). Der Fleck in der linken unteren Ecke ist artefiziell und markiert den Start, der länglich ovale auf der rechten Seite unverändertes ^{3}H-Cytosinarabinosid. In der Mitte zwischen beiden und auf gleicher Höhe von ^{3}H-Cytosinarabinosid erkennt man ^{3}H-Cytosinarabinosiddiphosphat und ein wenig darunter ^{3}H-Cytosinarabinosidtriphosphat.

Demzufolge kommt es bei Zugabe von Cytosinarabinosid, $2{,}5 \times 10^{-5}$ M ($2{,}5 \times 10^{-5}$ M = 4,8 µg/ml, therap. Dosis 10 µg/ml), zu einer ca. 50%-igen Hemmung der CDP-Reduktion. Derselbe Effekt läßt sich bei dem aus einem anaplastischen Schilddrüsencarcinom angereicherten Enzym demonstrieren (Abb. 35).

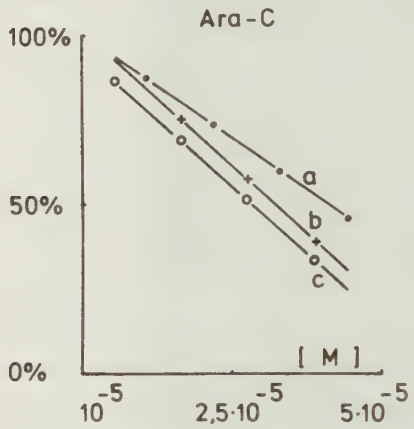


Abb. 35: Inhibitorwirkung von Cytosinarabinosid (= Ara-C). (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen, c = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus einem anaplast. Schilddrüsencarcinom).

Es läßt sich dabei nicht entscheiden, ob die Hemmung allosterisch erfolgt oder ob eine destruktive Konformationsänderung der Effektorseitengruppen induziert wird (31).

Bei Vergleichsmessungen mit d-Cytidin in äquimolarer Dosierung im gleichen Testsystem weist Cytosinarabinosid die höhere Hemmwirkung auf (d-Cytidin wird zum Teil zum Effektor d-CTP

phosphoryliert). Darüber hinaus blockiert Cytosin-arabinosid die DNA-Ploymerase (28).

d. Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff wird in der Zelle zu Hydroxylamin metabolisiert und führt zu einer irreversiblen Konformationsänderung der B_2-Untereinheit der Ribonucleosiddiphosphatreduktase (32, 33, 34).

Bei Applikation von Hydroxyharnstoff, $2x10^{-3}$ M ($2x10^{-3}$ M = 150 µg/ml, therap. Dosis = 150 µg/ml), tritt eine 70%-ige Hemmung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase ein (Abb. 36).

Dies gilt auch für eine Enzympräparation aus einem anaplastischen Schilddrüsencarcinom.

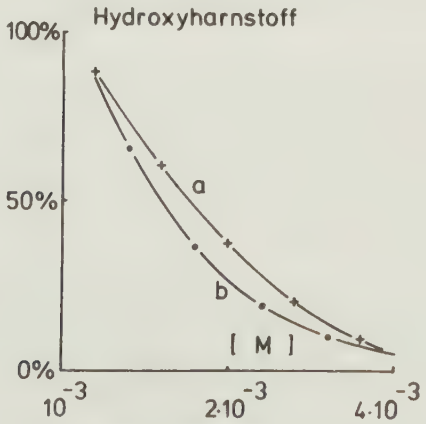


Abb. 36: Inhibitorwirkung von Hydroxyharnstoff (a = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen, b = Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Yoshida-Ascites-Sarkomzellen).

IV. DISKUSSION

Obwohl chromatographische Methoden zur Trennung und Bestimmung von Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphaten in der Literatur für Testgemische ausführlich beschrieben sind (35 - 50), können sie nicht ohne weiteres auf biologisches Material übertragen werden. Sie sind sehr aufwendig und ergeben in der Praxis kaum reproduzierbare Ergebnisse, da begleitende Salze und Proteine die chromatographische Trennung stören. Enzymatische Methoden können angewandt werden (51 - 52), sind jedoch unbrauchbar für Messungen, bei denen zugleich radioaktiv markierte und nicht markierte Ribonucleotide bestimmt werden sollen.

Die hier beschriebene dünnschichtchromatographische Methode erlaubt eine schnelle und empfindliche Bestimmung aller Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate mit einer Erfassungsgrenze von 0,5 nMol.

Durch die Vortrennung auf Kieselgel werden die Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate in zwei **Fraktionen** getrennt, von denen die eine ATP, dATP, GTP, dGTP, CTP und dCTP enthält, die andere UTP und dTTP. Bei Anwendung dieses Verfahrens können Ribonucleosidtriphosphate, die in sehr geringer Konzentration vorliegen (z.B. UTP und dTTP), einerseits gesammelt, andererseits von den in großer Menge vorliegenden getrennt werden. Daher zeigt die dTTP-Messung Übereinstimmung mit den in unserem Labor enzymatisch ermittelten Werten, während die dATP-, dGTP- und dCTP-Konzentration zu hoch berechnet ist. Dies ist auf ein Überlappen der Desoxyribonucleosidtriphosphat-Flecke mit denen der Ribonucleosidtriphosphate im Chromatogramm zurückzuführen (siehe auch LISS, 53).

Ein ähnliches Überlappen ist in Elutionsprofilen zu beobachten, wenn flüssigkeitschromatographische oder hochdruckflüssigkeitschromatographische Methoden angewendet werden.

Der in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesene sinkende ATP-Gehalt von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen mit Zunahme des Transplantationsalters und die gleichzeitige Glukoseverarmung der Ascites-Flüssigkeit (54) führen zu einer Einschränkung des Pentosephosphatcyclus. Dadurch wird zwangsläufig die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase vermindert, da $NADPH_2$ als H^+-Donator im Reduktionssystem anzusehen ist. Die Zelle versucht, dieses Synthesedefizit der "de-novo"-Synthese kompensatorisch durch eine Aktivitätssteigerung der Thymidinkinase auszugleichen.

Diese Befunde weisen auf eine begrenzte Anpassungsfähigkeit von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen an sich wandelnde Kulturbedingungen hin, wobei die DNA-Synthese weiterläuft.

Versuche, die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase unter in vitro-Bedingungen zu bestimmen, wurden bisher ausschließlich an schnellwachsenden Tiertumoren (55 - 59) oder Bakterien (60 - 66) vorgenommen sowie zum Teil an regenerierender Rattenleber (67).

Vergleichende Messungen der Steuermechanismen der Ribonucleosiddiphosphatreduktion an malignem und regenerierendem Gewebe bei identischer Enzympräparation wurden bisher nicht durchgeführt.

Vorliegende Untersuchungen an Transplantationstumoren und an proliferierenden Geweben ergaben keine spezifischen Aktivitätsunterschiede.

ELFORD et al. (59) berichtet nach Untersuchungen an Rattenhepatomen über Zusammenhänge zwischen Zellpro-

liferation und spezifischer Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase. Da diese Forschergruppe zu diesen Bestimmungen enzymhaltige Rohextrakte verwendete, sind die variierenden Reduktionsraten auf unterschiedliche Enzymkonzentrationen in den Tumoren und nicht auf spezifische Aktivitätsunterschiede der Reduktasen zurückzuführen. So konnte in unseren Untersuchungen aus Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen die doppelte Enzymmenge im Vergleich zu Yoshida-Ascites-Sarkomzellen extrahiert werden. Dabei war die spezifische Aktivität gleich.

Das pH-Optimum der Ribonucleosiddiphosphatreduktase beträgt pH 7,1 für das von uns verwendete Medium. Wie vergleichende Messungen von LARSSON und MOORE (6, 7) ergaben, pendelt das pH-Optimum zwischen pH 6,5 und pH 8,0. Es ist in großem Maße abhängig von der Art des Puffers, dessen Ionenstärke und weiteren Effektoren.

Nach 2/3-Hepatektomie werden etwa 60 % des verbleibenden Lebergewebes in die S-Phase eingeschleust, die in 24 bis 27 Stunden durchlaufen wird, wenn 150-200 g schwere Sprague-Dawley-Ratten verwendet werden. Der erste mitotische Gipfel liegt bei 32 Stunden nach der Operation. Der zweite hingegen ist nicht mehr scharf und liegt bei 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt sind etwa 2/3 des exstirpierten Lebergewebes ersetzt.

Vorliegende Messungen bestätigen die Ergebnisse von SÖDERHÄLL et al. (68), daß das Aktivitätsmaximum der Ribonucleosiddiphosphatreduktase nicht in der Zeit der S-Phase (24-28 Stunden postoperativ) liegt, sondern später: bei 48 Stunden.

Die Experimente zur Steuerung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase zeigen, daß Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und regenerierende Rattenleber als Substrat ADP, GDP, CDP und UDP verwenden, wobei die Desoxyribonucleo-

sidtriphosphate die Umsatzgeschwindigkeit hemmen oder beschleunigen.

Die K_m-Konstante für Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen beträgt $K_m = 2{,}5 \times 10^{-4}$ bei Verwendung von CDP als Substrat. Die Ribonucleosiddiphosphatreduktase aus Escherichia coli zeigt Werte zwischen $K_m = 2{,}5 \times 10^{-5}$ und $K_m = 8 \times 10^{-4}$ (20).

Der Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten im Ehrlich-Ascites-Carcinom-System und im regenerierenden Lebersystem weist keinerlei Substratpräferenz auf. Eine generelle Stimulierung der Reduktion aller vier Ribonucleosiddiphosphate durch dTTP, wie dies für Escherichia coli beschrieben wurde, konnte in den von uns untersuchten Systemen niemals nachgewiesen werden. Vielmehr nimmt dATP eine Zentralstellung als Inhibitor ein wie bei NOVIKOFF-Hepatomen (58).

Identische Hemmeffekte fanden GORDON et al. (57) bei Untersuchungen mit Cytolysaten aus Yaba-Pox-Virus-induzierten Tumoren, die mit CDP als Testsubstrat durchgeführt wurden.

Die Reduktaseeigenschaften von Lactobacillus leichm., Escherichia coli und T_4-Phagen-infizierten Colibakterien weichen untereinander erheblich ab. Sie können auch nach vorliegenden Untersuchungen nicht auf Säugetierextrakte übertragen werden. Generell läßt sich dagegen eine weitgehende Übereinstimmung der Steuermechanismen der Ribonucleosiddiphosphatreduktion bei allen bis jetzt untersuchten Säugetiersystemen beobachten.

Der "de-novo"-Syntheseweg der für die dTTP-Synthese notwendigen Vorstufe dUMP ist bisher noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Es werden drei Möglichkeiten diskutiert, von denen der ATP-abhängigen Desoxyuridinkinase (69) mit Sicherheit eine Nebenfunktion zufällt. Der zweite mögliche Syntheseweg besteht in

der Desaminierung von dCMP zu dUMP. Spezifisch wirkende dCMP-Desaminasen wurden u.a. aus regenerierender Rattenleber (70), Leukämiezellen (71) und aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (72) isoliert und auf ihre Rückkopplungsmechanismen hin untersucht. Die dritte Möglichkeit zur dUMP-Synthese besteht in der Reduktion von UDP.

Nach vorliegenden Untersuchungen ist dem zuletzt angeführten Syntheseweg die Hauptbedeutung zuzumessen. Zu den gleichen Ergebnissen gelangte die Forschergruppe um KOSHCHEEKO et al. (73 - 75), die daher von der "dUMP-de-novo"- über die UDP-Reduktion und von einer "dUMP-salvage-pathway"-Synthese über die Desaminierung von dCMP sprechen. Das von BRESNICK (76) vorgeschlagene Modell zur dTTP-Synthese sollte daher durch diese Begriffe erweitert werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Eine dünnschichtchromatographische Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung intrazellulärer Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphate wird beschrieben (Erfassungsgrenze 0,5 nMol). Mit dieser Methode werden die Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphatkonzentrationen in Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen und in menschlichen Tumoren unterschiedlicher Proliferation gemessen. Dabei zeigt sich eine enge Korrelation zwischen ATP-Gehalt der Zellen und der klinischen Wachstumsrate.

Hemmung bzw. Aktivierung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase sind an Ehrlich- und Yoshida-Tumorzellen sowie an regenerierender Rattenleber nahezu identisch.

Sie gleichen nicht den Steuermechanismen der Ribonucleosidreduktion, die von anderen Arbeitsgruppen an Escherichia coli nachgewiesen wurden.

Der "de-novo"-Syntheseweg der für die dTTP notwendigen Vorstufe dUMP ist nach vorliegenden Untersuchungen in der Reduktion von UDP zu sehen. Der Desaminierung von dCMP kommt untergeordnete Bedeutung zu.

Die Applikation cytocider Substanzen ergibt eine Hemmung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase durch Hydroxyharnstoff und Cytosinarabinosid in therapeutischer Dosierung. Eine Aktivitätsminderung ist ebenfalls bei Applikation von Bleomycin und Trisäthyleniminobenzochinon zu erzielen, wobei jedoch die therapeutische Dosis um ein Vielfaches überschritten werden muß. Die Hemmung der Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreduktase im zellfreien System durch Actinomycin C und D sowie durch Adriamycin und Daunomycin ist durch Komplexierung essentieller Metallionen erklärbar. Sie ist für die cytostatische Wirkung dieser Antibiotika an der Ganzzelle ohne Bedeutung.

VI. LITERATUR

1. MUELLER, G. und K. KAJIWARA: Fundamental techniques in virology, III. Synchronization of cells for DNA-synthesis. 21-27. New York and London: Academic Press 1969.

2. KRAUS, G.: Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen durch Thymidin und Hydroxyharnstoff. Diplomarbeit in Biochemie an der Universität Tübingen 1969.

3. BROWN, N. und P. REICHARD: Ribonucleoside diphosphate reductase, formation of active and inactive complexes of proteins B_1 and B_2. J. Mol. Biol. 46, 25-38 (1969).

4. BROWN, N. und P. REICHARD: Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. J. Mol. Biol. 46, 39-55 (1969).

5. MÜLLER, H., R. WAHL, I. KUNTZ und H. FOLLMANN: Enzymatic ribonucleotide reduction in wheat. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1299-1303 (1973).

6. MOORE, C. und P. REICHARD: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides, the cytidine diphosphate reductase system from NOVIKOFF-hepatoma. J. Biol. Chem. 239, 3453-3456 (1964).

7. LARSSON, A.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides, reduction of purine nucleotides with an enzyme system from Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 238, 3414-3419 (1963).

8. REICHARD, P.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides; formation of deoxycytidine diphosphate from cytidine diphosphate with enzymes from Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 237, 3513-3519 (1962).

9. SWINDLEHURST, M., J. BERRY und W. FIRSHEIN: The biosynthesis of DNA by insects, III, ribonucleotide reductase activity and the effect of hydroxyurea during the adult development of the cecropia silkworm. Biochim. Biophys. Acta 228, 313-323 (1971).

10. BROWN, N., N. CANELLAKIS, B. LUNDIN, P. REICHARD and L. THELANDER: Ribonucleoside diphosphate reductase, purification of the two subunits, proteins B_1 and B_2. Eur. J. Biochem. 9, 561-573 (1969).

11. FOSTER, J., H. ABBOTT und M.L. Terry: A simple procedure for removing salts from samples applied to ion-exchange thinlayer plates. Anal. Biochem. 16, 149-152 (1966).

12. TAUSCH, W.: Quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch direkte Photometrie. Meßtechnik 2, 38-44 (1972).

13. WEITZEL, G., F. SCHNEIDER, H. GUGLIELMI, J. SANDER, J. DURST und W. HIRSCHMANN: Cytostatische Effekte von Imidazol-(2) und dessen Derivaten. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346, 208-223 (1966).

14. KUMMER, D. und H.D. OCHS: Differenzierung der Wirkungsmechanismen alkylierender Cytostatika an Ehrlich-Ascites-Carcinom- und lymphatischen Leukämiezellen. Z. Krebsforschung 73, 315-328 (1970 B).

15. LIMBURG, H. und M. KRAHE: Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur. Dtsche. med. Wschr. 2, 1938-1946 (1964).

16. BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315-323 (1956).

17. LOWRY, O., N. ROSEBROUGH, A. FARR und R. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

18. GRAV, H.J.: Methods in Cancer Research, III Nucleosides- and Nucleotides-Metabolism. 243-389. New York and London: Academic Press 1967.

19. KUMMER, D.: Cytostatika-Sensibilitätstest solider, maligner Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten operativen und chemotherapeutischen Behandlung des Krebsleidens. Z. Krebsforschung 76, 124-139 (1971).

20. LARSSON, A. und P. REICHARD: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides, reduction of purine nucleotides; allosteric behavior and substrat specivity of the enzyme system from Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 241, 2540-2549 (1966).

21. MOORE, C. und R. HURLBERT: Reduction of cytidine nucleotides to deoxycytidine nucleotides by mammalian enzymes. Biochim. Biophys. Acta 55, 651-663 (1962).

22. GRUNICKE, H.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus alkylierender Cytostatika. Med. Welt Report 23, 93-95 (1972).

23. SCHARA, R. und W. MÜLLER: Über die Wechselwirkung des Actinomycin C_3 mit Mono-, Di- und Oligonucleotiden. Eur. J. Biochem. 29, 210-216 (1972).

24. MÜLLER, W. und D. CROTHERS: Studies of the binding of Actinomycin and related compounds to DNA. J. Mol. Biol. 35, 251-290 (1968).

25. WILLMANNS, W.: Bleomycin, Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse. 1. Dtsches. Bleomycin Symposium, veranstaltet von Heinrich Mack Nachf., Chem.-Pharm. Fabrik, 7918 Illertissen/Bayern. München 1973.

26. WILLMANNS, W. und H. MARTIN: Wirkung und Verteilung von Methotrexat im menschlichen Organismus bei der Leukämiebehandlung. Klin. Wschr. 46, 281-296 (1968a).

27. REICHARD, P. und O. SKÖLD: Possible enzymatic mechanism for the developement of resistance against fluoruracil in ascites tumors. Nature 183, 939-941 (1959).

28. FURTH, J. und S.S. COHEN: Inhibition of mammalian DNA-polymerase by the 5'-triphosphate of 1-ß-D-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 1-ß-D-arabinofuranosyladenine. Cancer Res. 28, 2061-2067 (1968).

29. KESSEL, D., T.C. HALL und D. ROBERTS: Uptake and phosphorylation of cytosine arabinoside by normal and leucemic human blood cells in vitro. Cancer Res. 29, 459-463 (1969).

30. WILLMANS, W.: Antimetabolite. Der Internist 12, 127-135 (1971).

31. FOLLMANN, H. und P.D.H. HOLGENKAMP: Interaction of ribonucleotide reductase with ribonucleotide analogs. Biochemistry 10, 186-191 (1971).

32. ELFORD. H.: Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. Biochim. and Biophys. Research Communications 33, 129-135 (1968).

33. MOORE, C.: The effects of ferrous ion and dithioerythritol on inhibition by hydroxyurea of ribonucleotide reductase. Cancer Res. 29, 291-295 (1969).

34. KRAKOFF, I.H., N.C. BROWN und P. REICHARD: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. Cancer Res. 28, 1559-1565 (1968).

35. RAAEN, H.: Resolution of complex mixtures of nucleic acid bases, nucleosides and nucleotides by twodimensional thin-layer chromatography on polyethylenimine-cellulose. J. Chromatog. 35, 531-537 (1968).

36. PATAKI, G. und A. NIEDERWIESER: Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds. Separation on PEI-cellulose layers using gradient elution and direct fluorimetry of spots. J. Chromatog. 29, 133-141 (1967).

37. RANDERATH, K. und E. RANDERATH: Ion-exchange chromatography of nucleotides on poly-(ethylenimine)-cellulose thin layers. J. Chromatog. 16, 111-125 (1964).

38. RANDERATH, E. und RANDERATH, K.: Resolution of complex nucleotide mixtures by twodimensional anion-exchange thin-layer chromatography. J. Chromatog. 16, 126-129 (1964).

39. NEUHARD, J., E. RANDERATH und K. RANDERATH: Ion-exchange thin-layer chromatography; XIII, Resolution of complex nucleoside triphosphate mixtures. Analyt. Biochem. 13, 211-222 (1965).

40. ANDERSON, N.G., J.G. GREEN, M. BARBER und C.F. LADD: Analytical techniques for cell fractions; III, Nucleotides and related compounds. Analyt. Biochem. 6, 153-169 (1963).

41. SCHEIT, K.H.: Silicagel-Dünnschichtchromatographie von Nucleosiden, Nucleotiden und Oligonucleotiden. Biochim. Biophys. Acta 134, 217-220 (1967).

42. WU, H.M. und S.A. CONTI: New method for the differentiation of ribonucleotides from deoxyribonucleotides. Analyt. Biochem. 29, 210-222 (1969).

43. CALDWELL, C.: Ion-exchange chromatography of tissue nucleotides. J. Chromatog. 44, 331-341 (1969).

44. PATAKI, G.: Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds; III, Separation of complex mixtures on cellulose layers. J. Chromatog. 29, 126-132 (1967).

45. BERGKVIST, R.: Ion-exchange chromatography of nucleoside polyphosphates.Acta Chem. Scand. 8, 1877-1879 (1954).

46. BERGKVIST, R. und A. DEUTSCH: The isolation of uridine-5'-triphosphate from muscle. Acta Chem. Scand. 8, 1880-1888 (1954).

47. SKOOG, L. und B.B. NORDENSKJOELD: Deoxyribonucleoside-triphosphate pools and DNA-synthesis in synchronized hamster cells. Eur. J. Biochem. 33, 428-432 (1973).

48. KOOF, H.P. und R.V. NORONHA: Bestimmung von Adenin, Adenosin und Adenosinmonophosphat durch Dünnschichtchromatographie mit densitometrischer Auswertung. Z. Analyt. Chemie 250, 124-125 (1970).

49. GREEMAN, D.L., R.C. HUANG, M. SMITH und L.M. FURROW: Thin-layer separation and quantitative elution of nucleosides and nucleotides. Anal. Biochem. 31, 348-357 (1969).

50. SCHETTINO, O. und M.I. la ROTONDA: Thin-layer ion-exchange chromatography of nucleotides; II, elution gradient fractionation. Bell. Soc. Ital. Biol. Sper. 44, 1989-1991 (1969).

51. SOLTER, A. und R. HANDSCHUHMACHER: A rapid quantitative determination of deoxyribonucleoside triphosphates based on the enzymatic synthesis of DNA. Biochim. Biophys. Acta 174, 585-590 (1969).

52. LISS, E., S. BRAMMER und H. SCHMIDT: Desoxyribonucleosidtriphosphatgehalte in Yoshida-Ascitestumorzellen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 354, 682-686 (1973).

53. LISS, E., H. SCHMIDT und P. NOWAK: Quantitative Bestimmung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten in Aszites-Tumorzellen unter Verwendung von ^{32}P. Z. Anal. Chemie 243, 142-147 (1968).

54. KUMMER, D.: Einfluß der Glukose auf die (^{14}C)-Thymidin-Einbaurate von Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen in vitro. Nucl. Med. 8, 196-205 (1969). Stuttgart: Schattauer-Verlag.

55. MOORE, E.C. und R.B. HURLBERT: Reduction of 5'-cytidylic acid to deoxycytidylic acid by mammalian enzymes. Biochim. Biophys. Acta 40, 371-372 (1960).

56. FUJIOKA, S. und R. SILBER: Purification and properties of ribonucleotide reductase from leucemic mouse spleen. J. Biol. Chem. 245, 1688-1693 (1970).

57. GORDON, H. und R. FIEL: Ribonucleotide reductase activity in cell-free extracts of Yaba poxvirus tumor and normal monkey tissues. Cancer Res. 29, 1350-1355 (1966).

58. MOORE, E.C. und R.B. HURLBERT: Regulation of mammalian deoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors. J. Biol. Chem. 241, 4802-4809 (1966).

59. ELFORD, H., M. FREESE, E. PASSAMANI und H. MORRIS: Ribonucleotide reductase and cell proliferation. J. Biol. Chem. 245, 5228-5233 (1970).

60. YAMADA, R. und H.P.C. HOLGENKAMP: The synthesis of a 5'-deoxyadenosylcobalamin-agarose adsorbent and its utility in the purification of ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem. 247, 6266-6270 (1972).

61. BLAKLEY, R.: Cobamides and ribonucleotide reduction. J. Biol. Chem. 240, 2173-2180 (1965).

62. ATKIN, C., L. THELANDER und P. REICHARD: Iron and free radical in ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem. 248, 7464-7472 (1973).

63. REICHARD, P.: The biosynthesis of deoxyribonucleotides. 4th FEBS Meeting's plenary lecture. European J. Biochem. 3, 259-266 (1968).

64. GLEASON, F.K. und H.P.C. HOLGENKAMP: Ribonucleotide reductase from Euglena gracilis, a deoxyadenosylcobalamin-dependent enzyme. J. Biol. Chem. 245, 4894-4899 (1970).

65. BERGLUND, O.: Ribonucleoside diphosphate reductase induced by bacteriophage T_4. J. Biol. Cehm. 247, 7276-7281 (1972).

66. THELANDER, L.: Physicochemical characterization of ribonucleoside diphosphate reductase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 248, 4591-4601 (1973).

67. BUCHER, N.: Regeneration of mammalian liver. Int. Rev. Cytol. 15, 245-300 (1963).

68. SÖDERHÄLL, S.S., A. LARSSON und L. SKOOG: Deoxyribonucleotide pools during liver regeneration. Eur. J. Biochem. 33, 36-39 (1973).

69. HARBERS, E.: Die Nucleinsäuren. Stuttgart: Thieme Verlag 1964.

70. MALEY, F. und G.F. MALEY: Nucleotide interconversions, II, elevation of deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthetase in regenerating rat liver. J. Biol. Chem. 235, 2968-2970 (1960).

71. SCHALHORN, B.: Die Desoxycytidinmonophosphat-Desaminase in normalen und leukämischen Leukozyten und Knochenmarkzellen. Inaugural-Dissertation Tübingen 1974.

72. FIALA, S. und A.E. FIALA: Deoxycytidylic acid deaminase in Ehrlich-ascites tumor cells. Cancer Res. 25, 922-932 (1965).

73. KOSHCHEENKO, A., E. ATABEKOV und E. ROMANTSEV: Action of prolonged γ-irradiation of rats on biosynthesis of pyrimidine ribonucleotides. Radiobiologie 15, 651-656 (1975).

74. KOSHCHEENKO, A. und E. ROMANTSEV: Radiosensitivity of the de-novo pathway of the pyrimidine nucleotide synthesis in rat tissues. Radiobiologie 14, 490-492 (1974).

75. ATABEKOV, E., A. KOSHCHEENKO und E. ROMANTSEV: Changes in the biosynthesis of uridylic nucleotides from uracil in rat tissues varying by radiosensitivity in early periods of radiation sickness. Radiobiologie 15, 331-335 (1975).

76. BRESNICK, E.: Methods in cancer research. Regenerating liver, an experimental model for the study of growth. VIII, 347-397. New York and London: Academic Press 1971.

Meine akademischen Lehrer waren:

Herr Professor Dr. Auterhoff
Herr Oberarzt P.D. Dr. Kummer
Herr Professor Dr. Arnold
Herr Professor Dr. Bader
Herr Professor Dr. Betz
Herr Professor Dr. Bürckle
Herr Professor Dr. Feneis
Herr Professor Dr. Fichtner
Herr Professor Dr. Graf
Herr Professor Dr. Graumann
Herr Professor Dr. Guglielmi
Herr Professor Dr. Haberland
Herr Professor Dr. Kovar
Herr Professor Dr. Krüger
Herr Professor Dr. Moll
Herr Professor Dr. Möricke
Herr Professor Dr. Müller
Herr Professor Dr. Mayer
Herr Professor Dr. Reinhardt
Herr Professor Dr. Rüdorff
Herr Professor Dr. Ritter
Herr Professor Dr. Sperlich
Herr Professor Dr. Seiler
Herr Professor Dr. Uehleke
Herr Professor Dr. Weber

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30